

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
13 de Noviembre de 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 03/093315 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C07K 16/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU03/00005

(22) Fecha de presentación internacional:  
28 de Abril de 2003 (28.04.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
CU2002/0086 29 de Abril de 2002 (29.04.2002) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTEC-  
NOLOGÍA [CU/CU]; Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán,  
Playa., 10600 Ciudad de la Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): GAV-  
ILONDO COWLEY, Jorge, Víctor [CU/CU]; Calle G  
No. 460 Apto. 11 e/ 19 y, 21 Plaza., 10400 Ciudad de La

Habana (CU). AYALA ÁVILA, Marta [CU/CU]; Calle  
186, No. 3117 Apto 3D e/, 31 y 33 Cubanacán, Playa,  
Ciudad de La Habana 11600. Cuba, 10600 Ciudad de  
La Habana (CU). FREYRE ALMEIDA, Freya, de los  
Milagros [CU/CU]; Calle 33, e/ 186 y 188 Edif. C-15,  
Apto 06, Cubanacán, Playa., 11600 C. Habana (CU).  
ACEVEDO CASTRO, Boris, Ernesto [CU/CU]; Calle  
Segunda # 565 entre, Ayestarán y Ayuntamiento, Plaza.,  
12000 Ciudad de La Habana (CU). BELL GARCÍA,  
Hanssel [CU/CU]; Calle 62 #906, 2do. piso, apto 16,  
entre 9 y 11. Ampliación de, Almendares, Playa., 10600  
Ciudad de la Habana (CU). ROQUE NAVARRO, Lour-  
des, Tatiana [CU/CU]; Calle 13 No. 4211 e/. 42 y 44,  
Playa., 11300 Ciudad de la Habana (CU). GONZÁLEZ  
LÓPEZ, Luis, Javier [CU/CU]; Calle 186, # 3115, e/31  
y 33, piso 8, Apto C. Playa., 10600 Ciudad de la Habana  
(CU). CREMATA ALVAREZ, José, Alberto [CU/CU];  
Ave 31 No. 18207 e/ 182 y 184, Apto. 46, Cubanacán,  
Playa., 11600 Ciudad de la Habana (CU). MONTESINO  
SEGUI, Raquel [CU/CU]; Calle 184 No. 3112 e/31 y 33,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: SPECIFIC ANTIBODY FRAGMENTS FOR THE HUMAN CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA)

(54) Título: FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO  
HUMANO (CEA)

(57) Abstract: The invention relates to mono- and bivalent (diabody) single-chain Fv-type (scFv) antibody fragments which are obtained using recombinant DNA techniques from the carcinoembryonic anti-antigen (CEA) monoclonal antibody (McA) CB/ior-CEA.1. The aforementioned McA has a high affinity for the CEA and is used in the diagnosis and monitoring of colorectal tumours in humans. As with the original McA, diabody and monovalent scFv fragments exhibit high affinities for the human CEA and recognise an epitope that is dependent on carbohydrate conservation. The diabody and monovalent scFv fragments have affinity constants for the CEA of  $(5.0 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$  and  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$  respectively. The two aforementioned fragments do not display cross-reactivity with normal human tissues and cells, except for the normal colonic mucosa where the CEA is occasionally present. Said fragments can be produced through expression in recombinant micro-organisms from the cloning of nucleic acid sequences that code for variable regions obtained from the hybridoma that is produced by the CB/ior-CEA.1 McA. As with the original McA, the diabody and the monovalent scFv have a capacity for their *in vivo* identification in rats of human CEA-producing cells which grow forming tumours. The monovalent scFv and diabody do not possess Fc domains and the molecular sizes of said monovalent scFv and diabody are 5 and 2.5 times, respectively, less than the rat McA. As a result, the aforementioned monovalent scFv and diabody can better penetrate tissues *in vivo* and are less immunogenic in humans.

WO 03/093315 A2

(57) Resumen: Fragmentos de anticuerpo tipo Fv de cadena sencilla (scFv) mono y divalente (diacuerpo), obtenidos por técnicas de ADN recombinante a partir del anticuerpo monoclonal (AcM) anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) CB/ior-CEA.1. Este AcM tiene muy alta afinidad por el CEA y se emplea en el diagnóstico y seguimiento de tumores colorectales del hombre. Como el AcM original, los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo exhiben altas afinidades por el CEA humano y reconocen un epítipo dependiente de la conservación de carbohidratos. El fragmento scFv monovalente y diacuerpo tienen constantes de afinidad por el CEA de  $(5.0 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$  y  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$ , respectivamente. Estos dos fragmentos no presentan reactividad cruzada con células y tejidos humanos normales, excepto la mucosa colónica normal donde el CEA está ocasionalmente presente. Los fragmentos pueden producirse mediante la expresión en microorganismos recombinantes, a partir del clonaje de secuencias de ácidos nucleicos codificantes para regiones variables obtenidas del hibridoma que produce el AcM CB/ior-CEA.1. Al igual que el AcM original, el scFv monovalente y el diacuerpo tienen la capacidad de identificar *in vivo* en ratones a células productoras de CEA humano que crecen formando tumores. El scFv monovalente y el diacuerpo tienen un tamaño molecular 5 y 2.5 veces inferior, respectivamente, que el AcM de ratón y no poseen dominios Fc, lo que les confiere el potencial de penetrar mejor los tejidos *in vivo* y de ser menos inmunogénicos en el hombre.



Apto. 50 Cubanacán, Playa., 11600. Ciudad de la Habana (CU).

(74) **Mandatario:** POVEDA MARCHECO, Argia; Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de la Habana (CU).

(81) **Estados designados (nacional):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados (regional):** patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

**MEMORIA DESCRIPTIVA****FRAGMENTOS DE ANTICUERPO ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO HUMANO (CEA)****5 CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se relaciona con la Rama de la Inmunología y en particular se refiere a fragmentos de anticuerpo tipo Fv de cadena sencilla, en sus formas mono y divalente (diacuerpo), obtenidos por técnicas de ADN recombinante a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón de eficacia clínica probada, que es específico para el antígeno carcinoembrionario humano.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de unos 180 kDa de peso molecular, secretada preferentemente por las células de los tumores humanos del tracto gastrointestinal y de otros carcinomas, aunque también se puede detectar en algunos tejidos no malignos como la mucosa colónica. Su rol fisiológico no ha sido totalmente dilucidado, y hasta el momento se cree que está asociado de alguna forma a los procesos de adhesión celular. (Gold P, Freedman SO. Journal of Experimental Medicine 122: 467; 1965; Zimmermann W et al. PNAS USA 84: 2960-2964; 1987; Paxton RJ et al. PNAS USA 84: 920-924, 1987; Beauchemin N et al. Molec. Cellular Biol. 7: 3221-3230, 1987; Gold P, Goldenberg NA. MJM 3:46-66, 1997).

El CEA es un integrante de la superfamilia de las inmunoglobulinas, debido a su estructura caracterizada por dominios repetitivos (Oikawa S et al. BBRC 144: 634-642, 1987; Thompson J, Zimmermann W. Tumour Biology 9: 63-83, 1988; Hammarstrom S. Seminars in Cancer Biology 67-81, 1999). El CEA tiene una alta homología con otras moléculas de esta superfamilia, tales como el NCA, el antígeno del meconio, la Glicoproteína biliar tipo A, y la Glicoproteína b específica del embarazo (von Kleist S, Burtin P. Immunodiagnosis of Cancer. Marcel Dekker. 322-341, 1979; Buchegger, F. et al. Int. J. Cancer 33: 643-649, 1984; Matsuoka Y et al. Cancer Res. 42:2012-2018, 1982; Svenberg T. Int. J. Cancer 17:588-596, 1976).

La elevación en los niveles de CEA circulantes se considera desde hace muchos años como uno de los mejores indicadores de una posible recidiva y/o de metástasis, en pacientes operados de tumores primarios colorectales que expresen este antígeno (Gold P, Goldenberg NA. MJM 3:46-66, 1997). La medición de CEA circulante se ha extendido también como método para el seguimiento de otros carcinomas humanos (mama,

pulmón), en los casos en que se hayan podido demostrar niveles pre-operatorios significativos de este marcador tumoral (Gold P, Goldenberg NA. MJM 3:46-66, 1997).

Desde el descubrimiento de la tecnología de generación de anticuerpos monoclonales (AcM; Kohler G, Milstein C. Nature 256:52-53, 1975), los inmunoensayos para la medición  
5 del CEA circulante han ganado en especificidad y su uso se ha difundido extraordinariamente.

El CEA se ha estudiado también desde hace muchos años como una posible "diana celular" con vistas a dirigir específicamente isótopos radiactivos para el diagnóstico *in vivo* (Goldenberg DM Int. J. of Biol. Markers 7; 183-188, 1992) y la radioterapia *in situ*  
10 (Ledermann et al., Int. J. Cancer 47; 659-664, 1991). También se contempla su uso para dirigir toxinas, drogas y otros productos bioactivos hacia las células tumorales (Bagshawe KD. Drug Dev. Res. 34:220-230, 1995).

Los anticuerpos anti-CEA han sido los vehículos empleados por excelencia para estos fines, comenzando con preparaciones policlonales, para seguir posteriormente con AcM  
15 de ratón, sus fragmentos Fab, fragmentos de anticuerpos obtenidos por ingeniería genética a partir de los AcM de ratón y más recientemente de bibliotecas de anticuerpos murinos y humanos desplegadas en fagos filamentosos (Hammarstrom S et al. Cancer Res. 49, 4852-4858, 1989; Hudson PJ Curr. Opinion Immunology 11:548-557, 1999; Griffiths AD et al. EMBO J. 12, 1993; 725-734; Griffiths AD et al. EMBO J. 13 3245-3260,  
20 1994; WO93/11236; Chester K et al 1995, WO 95/15341; Allen DJ et al. 1996, US5872215).

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas como la *E. coli* y en otros microorganismos está bien establecido en el arte (Pluckthun, A. Bio/Technology 9: 545-551, 1991; Gavilondo J, Larrick JW. Biotechniques 29: 128-132,  
25 134-136, 2000). La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células eucariotas superiores en cultivo también es conocida para aquellos diestros en el arte (Reff ME. Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576, 1993; Trill JJ et al. Curr. Opinion Biotech 6: 553-560, 1995).

El AcM de ratón denominado indistintamente como CB-CEA.1 o ior-CEA.1 (referido desde ahora como CB/ior-CEA.1) es conocido a partir del estado del arte. Este AcM posee una alta especificidad para el CEA humano, no presenta reacciones cruzadas indeseables con moléculas como el NCA, ni reconoce tejidos normales, excepto las células del epitelio normal de colon, donde el CEA se puede encontrar habitualmente presente y polarizado (Tormo B et al. APMIS 97: 1073-1080, 1989). Este AcM tiene muy  
30 alta afinidad por el CEA (Pérez L et al. Applied Biochem. Biotechnol. 24: 79-82, 1996). Este AcM marcado con <sup>99m</sup>Tc ha sido empleado exitosamente en el diagnóstico y seguimiento

de tumores colorectales del hombre. Los estudios clínicos de radioinmunodetección diagnóstica demostraron que posee un 91.3% de sensibilidad, un 77.1% de especificidad, y un 82.8% de valor predictivo positivo (Oliva JP et al. Rev Esp Med Nucl. 13:4-10, 1994). Ello lo hace superior en desempeño al único otro anticuerpo monoclonal anti-CEA empleado actualmente en la clínica en el mundo para estos fines, el CEA-Scan (<sup>99m</sup>Tc-Arcitumomab) de Immunomedics (Morris Plains, NJ, EEUU).

En 1992 se reportó el desarrollo de un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), derivado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) a partir de ARN extraído del hibridoma productor del AcM CB/ior-CEA.1 (Ayala M et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992). En la estrategia experimental seguida, la amplificación de los dominios variables del CB/ior-CEA.1 se realizó con oligonucleótidos degenerados para las regiones marcos de ambos dominios variables. El scFv se produjo en *E. coli* y demostró reconocer el CEA en ELISA y en estudios de citoquímicos, pero con una afinidad por el antígeno inmovilizado unas 200 veces inferior al Fab obtenido por vía natural (Pérez L et al. Applied Biochem. Biotechnol. 24: 79-82, 1996). Este mismo fragmento scFv se clonó, expresó y produjo en *Pichia pastoris* (Freyre FM et al. J Biotechnol. 76(2-3):157-163, 2000) sin que se produjeran mejoras en la afinidad por el CEA humano, y los estudios realizados en animales de experimentación con el fragmento radiomarcado indicaron una biodistribución anómala (Pimentel GJ et al. Nucl Med Commun. 22:1089-94, 2001), por lo que no se continuó su desarrollo ulterior.

#### ESENCIA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a fragmentos de anticuerpo tipo Fv de cadena sencilla (scFv), en sus formas mono y divalente (diacuerpo), obtenidos por técnicas de ADN recombinante a partir del anticuerpo monoclonal (AcM) anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) CB/ior-CEA.1 (Tormo B et al. APMIS 97: 1073-1080, 1989). Este AcM tiene muy alta afinidad por el CEA (Pérez L et al. Applied Biochem. Biotechnol. 24: 79-82, 1996) y ha sido empleado exitosamente en el diagnóstico y seguimiento de tumores colorectales del hombre (Oliva JP et al. Rev Esp Med Nucl. 13:4-10, 1994). Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo reportados en la presente invención pueden producirse mediante su expresión en microorganismos recombinantes, como bacterias y levaduras. Al igual que el AcM original, los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo son específicos para un epítipo del CEA humano que depende de la conservación de los carbohidratos y exhiben altas afinidades por este antígeno. Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo tienen un patrón de reconocimiento *in vitro* de células y tejidos humanos normales y tumorales semejante al del AcM original y, como este, una vez radiomarcados poseen la capacidad de identificar células tumorales que expresan CEA

humano creciendo como tumores en ratones atímicos congénitos. Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo no poseen dominios Fc y poseen tallas moleculares inferiores que el AcM de ratón, lo que les confiere el potencial de penetrar mejor los tejidos *in vivo* y de ser menos inmunogénicos al ser aplicados en el hombre con propósitos diagnósticos o  
5 terapéuticos.

Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo reportados en esta invención poseen importantes diferencias de aminoácidos en los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL), respecto a otro fragmento scFv desarrollado previamente a partir del mismo AcM, y lo superan en afinidad por el CEA, en desempeño para el reconocimiento de  
10 células y tejidos, y en eficacia para la localización de tumores que producen CEA humano creciendo *in vivo* en ratones.

Los fragmentos de anticuerpo recombinantes scFv monovalente y diacuerpo reportados en esta invención se desarrollaron empleando la RCP y técnicas de clonaje y expresión en microorganismos recombinantes, a partir del ARN extraído del hibridoma CB/ior-CEA.1. Para la amplificación y aislamiento de las secuencias de bases codificantes de los  
15 dominios VH y VL del AcM se emplearon juegos de oligonucleótidos diferentes a los usados para obtener un scFv antes reportado (Ayala et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992). En la invención se muestra que los nuevos scFv monovalente y el diacuerpo poseen importantes diferencias en la secuencias de aminoácidos de los dominios VH y  
20 VL, respecto a un scFv obtenido previamente, y que estos se manifiestan en la forma de 16 aminoácidos entre los marcos 1 y 3 (FR3) y la región determinante de la complementaridad 2 (CDR2) del dominio VH diferentes respecto al scFv obtenido previamente, y 3 aminoácidos entre el FR1 y FR3 del dominio VL distintos respecto al  
25 scFv obtenido previamente. Ello indica que estos dominios tienen probablemente un origen clonal diferente a los reportados en Ayala et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992. En el caso del diacuerpo, este se diferencia del scFv obtenido previamente también en el tamaño y la composición aminoacídica del segmento de unión (linker) que se emplea en la fabricación de la molécula tipo scFv.

Estos cambios se reflejan de forma sorprendente en las propiedades bioquímicas y  
30 biológicas de los nuevos fragmentos, y le otorgan un comportamiento muy similar al AcM CB/ior-CEA.1 y muy superior al del scFv reportado anteriormente. El nuevo fragmento scFv monovalente, que posee idéntico segmento de unión (linker) que el scFv antes reportado (Ayala et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992) pero los cambios de aminoácidos en los dominios variables mencionados anteriormente, tiene una constante de afinidad  
35 por el CEA humano muy superior a la exhibida por el scFv antes reportado. A su vez, el diacuerpo supera en constante de afinidad por el CEA humano a las dos formas scFv

monovalentes. Los dos nuevos fragmentos scFv monovalente y diacuerpo conservan las propiedades de especificidad del AcM original en cuanto a reconocimiento del CEA, identificación de células y tejidos tumorales, ausencia de reactividad cruzada con el NCA y capacidad de acumularse selectivamente en un tumor productor de CEA humano  
5 transplantado en ratones, todo ello con un desempeño muy superior al scFv obtenido previamente.

Los dos nuevos scFv monovalente y diacuerpo tienen, respectivamente, tamaños moleculares al menos 5 y 2.5 veces menores que el AcM original, lo que les confiere el potencial para penetrar mejor los tejidos y ser menos inmunogénicos en el humano, todo  
10 lo cual los hace más atractivos y presumiblemente superiores que AcM original CB/ior-CEA.1 para dirigir radioisótopos, drogas, toxinas y otros elementos bioactivos a tumores que expresan el CEA humano.

En la presente invención se demuestra como es posible amplificar mediante la RCP los dominios variables VH y VL del AcM CB/ior-CEA.1 empleando oligonucleótidos sintéticos  
15 que hibridan en las secuencias de bases que codifican para los péptidos señales y dominios constantes CH1 y Ck. Se muestra también como es posible ensamblar los dominios variables VH y VL amplificados, en este orden, mediante la RCP y obtener diferentes formas de fragmentos scFv manipulando el tamaño del segmento de unión (linker) que conecta estos dominios. Empleando 14 aminoácidos se origina una forma  
20 scFv monovalente, y reduciendo estos a cinco se produce una forma scFv tipo diacuerpo.

En la invención se demuestra que es posible expresar los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo en la bacteria *E. coli* y en la levadura *Pichia pastoris* y que estos fragmentos identifican *in vitro* de forma específica el CEA humano unido o no a células tumorales. En la presente invención también se demuestra que el scFv monovalente y el diacuerpo  
25 radiomarcados identifican *in vivo* células tumorales que expresan CEA humano y que crecen como tumores en ratones, exhibiendo un comportamiento muy semejante al del AcM CB/ior CEA.1, y un desempeño muy superior al del scFv obtenido previamente. En la presente invención también se muestran métodos para purificar y caracterizar los nuevos fragmentos scFv monovalente y diacuerpo.

30 Los fragmentos de anticuerpo descritos en esta invención son útiles para su aplicación en el diagnóstico y terapia del cáncer, con las ventajas de que provienen de un AcM de probada eficacia clínica, y de que su menor tamaño y ausencia de dominio Fc permiten tanto una mejor penetración en tejidos, como su uso en tratamientos repetidos por su menor capacidad de inducción de una respuesta humana anti-inmunoglobulina de ratón  
35 (HAMA; Schroff et al. Cancer Res 45: 879-885, 1985; DeJager et al. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 29:377, 1988). Las respuestas HAMA son inconvenientes para el tratamiento

ya que llevan a la neutralización del efecto biológico del anticuerpo administrado, la consiguiente disminución de la dosis, y pueden causar respuestas alérgicas, enfermedad del "suero" y afectaciones renales.

#### TERMINOLOGIA

##### 5 Anticuerpos y sus Fragmentos Específicos

Los términos describen una inmunoglobulina o partes de esta con especificidad antigénica, ya sean naturales o producidas parcial o totalmente de forma sintética. Los términos cubren también cualquier polipéptido o proteína que posea un dominio de unión que sea el dominio de unión del anticuerpo, u homólogo a este. Estos pueden ser  
10 producidos de forma natural o sintética, y en este último caso de manera total o parcial. Ejemplos de anticuerpos son las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas, y de fragmentos aquellos contienen uno o más dominios de unión al antígeno tales como Fab, scFv, Fv y los diacuerpos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier polipéptido que  
15 comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o producido de forma sintética, tanto total como parcialmente y moléculas quiméricas que comprendan un dominio de unión de inmunoglobulina, o su equivalente, fusionado a otro polipéptido.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son: (i) el fragmento Fab que  
20 incluye los dominios VL, VH, CL y CH1 de una inmunoglobulina; (ii) el fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento scFv, donde los dominios VH y VL de un único anticuerpo se unen con un segmento de unión peptídico (linker) que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, Science 242:  
25 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA 85: 5879-5883, 1988); (v) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos de forma similar al scFv, pero donde el pequeño tamaño del linker no permite a los dominios VH y VL de una misma molécula scFv asociarse entre sí, y los sitios de unión al antígeno se forman mediante la asociación de dos o más scFv (WO94/13804; Holliger P et al. PNAS USA 90 6444-6448,  
30 1993); (vi) otros fragmentos como el dAb (Ward SE et al., Nature 341: 544-546, 1989), regions CDR aisladas, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y dímeros biespecíficos de scFv (PCT/US92/09965; Holliger P, Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449, 1993; de Haard, H et al. Adv. Drug Delivery Rev. 31:5-31, 1998).

Los diacuerpos y los scFv se pueden construir sin region Fc, usando sólo los dominios  
35 variables, reduciendo potencialmente los efectos de reacciones anti-isotipo al ser suministrados a humanos. También son particularmente útiles al poderse producir en



*E.coli* y en levaduras recombinantes. Su tamaño menor al de una inmunoglobulina completa los dota de una mayor penetrabilidad potencial en los tejidos.

#### Sitio de unión al antígeno

Este término describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que interactúa específicamente con todo un antígeno o parte del. Cuando el antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítopo. Un sitio de unión de un anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Preferiblemente, un sitio de unión a antígeno comprende la región (o dominio) variable de cadena ligera (VL) y la región (o dominio) variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo.

#### Específico

Se refiere a la situación en la cual un anticuerpo o fragmento de este no presenta una unión significativa a otras moléculas diferentes de su pareja de unión específica. Este término es también aplicable al caso donde un sitio de unión a antígeno es específico para un epítopo particular que aparece en un número de antígenos relacionados o no, en cuyo caso el sitio de unión será capaz de unirse a varios antígenos de porten el epítopo.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Mediante la presente invención se obtienen moléculas polipeptídicas específicas formadas por uno o más sitios de unión al antígeno, provenientes de un AcM de ratón que es específico para el CEA humano. El sitio de unión al antígeno se ensambla en la forma de fragmento de anticuerpo monovalente, divalente u otras, según la forma en que la molécula polipeptídica sea construida.

La molécula polipeptídica en forma de fragmento scFv monovalente específico para el CEA humano exhibe una constante de afinidad para este antígeno de  $(5.0 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ , y comprende dominios VH y VL unidos en ese orden por un segmento de unión (linker) de 14 aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos como la que se presenta en la SEC ID No. 16.

La molécula polipeptídica en forma de fragmento scFv divalente (diacuerpo) específico para el CEA humano exhibe una constante de afinidad para este antígeno de  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$ , y comprende el apareamiento de dos moléculas idénticas formada cada una por dominios VH y VL unidos en ese orden por un segmento de unión (linker) de cinco aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos como la que se presenta en la SEC ID No. 17.

En otro aspecto de la invención, los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo no se unen, o no lo hacen de manera significativa, con tejidos normales o con células de los

siguientes tejidos normales: hígado, riñón, pulmón, testículos, sangre, bazo, páncreas y sangre. En el caso de la mucosa colónica, los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo reaccionan exclusivamente con los productos de secreción luminal y en zonas apicales de algunas glándulas. La ausencia de reactividad de los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo con linfocitos y neutrófilos normales es indicativo de que no existe un nivel importante reactividad cruzada con el antígeno NCA (von Kleist S, Burtin P. Immunodiagnosis of Cancer. Marcel Dekker. 322-341, 1979; Buchegger, F. et al. Int. J. Cancer 33; 643-649, 1984).

Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo pueden unirse a CEA soluble, CEA adsorbido en superficies sólidas, o CEA asociado a células que lo producen, y a tejidos tumorales entre los que sobresalen los adenocarcinomas colorectales, de mama, de pulmón, de páncreas y de estómago humanos. Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo y el AcM CB/ior-CEA.1 se unen a CEA soluble y adsorbido a superficies sólidas de forma dependiente de la conservación de la glicosilación del CEA humano, lo que sugiere que los carbohidratos de este antígeno están implicados en el reconocimiento.

Moléculas polipeptídicas derivadas de los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo reportados en esta invención y que retengan la capacidad de unir CEA, la afinidad reportada para estos, reconocimiento epitopico específico y desempeño biológico y bioquímico semejantes y equivalentes a los fragmentos descritos en esta invención son consideradas formas variantes equivalentes y están contenidas en la presente invención. Estas moléculas polipeptídicas pueden tomar la forma de otros fragmentos de anticuerpo recombinantes, como scFv donde el dominio VL esté antepuesto al VH, o fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Facb, scFv triméricos y tetraméricos, etc. (Winter G, Milstein C. Nature 349: 293-299, 1991; WO94/13804; de Haard, H et al. Adv. Drug Delivery Rev. 31:5-31, 1998), y se usen otros segmentos de union (linkers) conocidos en el estado del arte. También pueden estar en la forma de moléculas de anticuerpo biespecíficas, donde una porción de las mismas conserven su especificidad para CEA, y otra tenga una especificidad diferente.

Están igualmente contenidas en la presente invención aquellas formas variantes de los fragmentos scFv monovalente y el diacuerpo que cumplan con las características descritas en los párrafos anteriores, y que hayan sido derivadas de la llamada "humanización por reducción de la inmunogenicidad", en que epítopes B y T presentes en los dominios variables son modificados de forma que no alteran la especificidad del reconocimiento antigénico, pero reducen la inmunogenicidad de la molécula resultante en el humano, por ejemplo, como es revelado en Carr FJ et al. 2000 EP 983303A1 y en Rodriguez Perez R et al. US 5712120-A. Igualmente se consideran formas variantes

5 contenidas en esta invención aquellas producidas por el llamado "transplante de CDR" en que las secuencias de CDR de un primer anticuerpo son colocadas en el marco de secuencias que no son de ese anticuerpo, por ejemplo, como es revelado en EP-B-0239400, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y que retengan la capacidad de unir CEA con afinidad similar, capacidad de competencia, reconocimiento epitopico particular y desempeño biológico y bioquímico semejante y equivalente a los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo descritos en esta invención.

10 Además de las secuencias de anticuerpo, las moléculas polipeptídicas contenidas en esta invención pueden comprender otros aminoácidos que formen un péptido o un polipéptido, o que añadan a la molécula una característica funcional diferente de la de unir al antígeno CEA, como por ejemplo una marca para purificarlas o ser identificadas, una enzima o sus fragmentos, un modificador de la respuesta biológica, una toxina o droga, y así sucesivamente.

15 De acuerdo a esta invención los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo pueden ser suministrados de forma aislada o purificada.

La presente invención prevé el uso de alguna de las moléculas polipeptídicas descritas arriba como un reactivo diagnóstico para formas de cáncer humano que expresan el CEA, como por ejemplo, los adenocarcinomas de colon, pulmón o mama, y otros.

20 las moléculas polipeptídicas específicas al CEA descritas arriba pueden ser radiomarcadas y empleadas como agentes para obtener imágenes para demostrar de forma específica la presencia y localización de tumores que expresan CEA en el hombre. La presente invención proporciona un método de determinar la presencia de una célula o tumor que expresen CEA, siendo el método el poner en contacto las células con una molécula polipeptídica como las descritos, y determinando la unión de estas a las células.

25 El método puede ser desarrollado *in vivo*, o en una muestra de células removidas del cuerpo, ya sea *in vitro* o *ex vivo*.

La presente invención proporciona un método para la unión de una molécula polipeptídica como las descritas antes, al CEA humano. Esta unión puede tener lugar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Si la unión es *in vivo*, el método puede comprender la administración de la

30 molécula polipeptídica a un mamífero, sea uno o varios individuos. Como se demuestra experimentalmente aquí, los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo de acuerdo a esta invención se unen al CEA humano expresado por células tumorales de ratón transfectadas, que crecen como tumores una vez trasplantadas a ratones, proporcionando un modelo experimental útil para el estudio, la investigación y el

35 desarrollo de moléculas con unión específica y de sus propiedades.

Las reactividades de los anticuerpos sobre muestras celulares se pueden detectar mediante cualquier medio apropiado. Su marcaje con moléculas reporteras individuales es una posibilidad. Las moléculas reporteras pueden generar señales capaces de ser detectadas de forma directa o indirecta y preferentemente medibles. La unión de las

5 moléculas reporteras puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente. La unión mediante un enlace peptídico puede resultar de la expresión recombinante de una fusión génica que una al anticuerpo y la molécula reportera. La forma de determinar la unión no es una característica de la presente invención y aquellos diestros en el arte son capaces de escoger un modelo adecuado de acuerdo a su preferencia y conocimientos generales.

10 Cuando se use un radionúclido como  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para marcar los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo y sus formas variantes equivalentes, si estos se localizan preferiblemente en el tumor, y no en los tejidos normales, la presencia del marcaje radioactivo en el tejido tumoral puede ser detectado y cuantificado usando una cámara gamma. La calidad de la imagen del tumor obtenida se correlaciona directamente con la

15 relación señal:fondo (Goldenberg DM. Int. J. of Biol. Markers 1992, 7; 183-188). El uso experimental de  $^{125}\text{I}$  se ejemplifica en el texto.

La presente invención también ofrece elementos para que los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo y sus formas variantes equivalentes, como descritos antes, puedan ser empleados como un reactivo terapéutico, por ejemplo, cuando se acoplan,

20 cojugan o unen a moléculas con poder terapéutico, o se generan como una proteína recombinante de fusión. Los fragmentos scFv monovalente y diacuerpo y sus formas variantes equivalentes de acuerdo a la presente invención pueden ser usados para dirigir una toxina, radiactividad, células T y NK, u otras moléculas a tumores que expresan CEA, o para desarrollar una respuesta anti-idiotípica en el organismo que pueda conducir a un

25 efecto terapéutico deseado. De acuerdo a ello, otros aspectos de la invención proporcionan elementos para métodos de tratamiento que comprenden la administración de un fragmento scFv monovalente, diacuerpo o sus formas variantes equivalentes como medicamentos o composiciones farmacéuticas.

De acuerdo a la presente invención, las composiciones pueden ser administradas a

30 individuos, preferiblemente en una cantidad "terapéuticamente efectiva" suficiente para demostrar un beneficio al paciente, en forma del mejoramiento de al menos un síntoma. Detalles relativos a la cantidad a administrar, la frecuencia e intervalos de administración, dependerán de la naturaleza y severidad de la enfermedad que es tratada, y estas decisiones son la responsabilidad de especialistas y otros doctores en medicina. Las

35 dosis apropiadas de un anticuerpo son bien conocidas en el arte (Ledermann J. A. et al.

Int J. Cancer 47: 659-664, 1991; Bagshawe KD et al. Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals 4: 915-922, 1991).

Una composición puede administrarse aisladamente o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial dependiente de la enfermedad que  
5 vaya a ser tratada.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo a la presente invención, y para ser empleadas de acuerdo a la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, tampón, estabilizador o "carrier" farmacéutico aceptados, u otros materiales bien conocidos para aquellos diestros en el arte. Estos  
10 materiales no deben ser tóxicos, no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo y su naturaleza precisa puede depender de la ruta de administración, sea oral, o por inyección, por ejemplo, endovenosa.

Los fragmentos scFv monovalente, diacuerpo y sus formas variantes equivalentes de acuerdo a la presente invención pueden ser fabricados por la expresión del ácido nucleico que lo codifica. El ácido nucleico que codifica para cualquiera de las moléculas  
15 polipeptídicas descritos antes forma parte de la presente invención, como también un método para la expresión de dicho ácido nucleico. En una realización preferente, el ácido nucleico puede codificar para las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID No. 16 y 17.

20 Para la expresión recombinante de los fragmentos scFv monovalente, diacuerpo y sus formas variantes equivalentes se pueden escoger o construir vectores apropiados que contengan las secuencias regulatorias adecuadas al caso, incluyendo promotor, terminador, aumentador (enhancer), poliadenilación, genes marcadores y otras secuencias pertinentes. Los vectores pueden ser plásmidos. Muchas técnicas y  
25 protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa, la mutagénesis, la secuenciación, la introducción de ADN en células y la expresión de genes, el análisis de proteínas, y otras se describen en detalle en varias referencias, como Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al.,  
30 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 ó Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992 ó Erlich HA PCR Technology, Stockton Press, 1989. Las revelaciones que aparecen en estas referencias se incorporan en este documento mediante su cita.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una célula hospedera conteniendo un  
35 ácido nucleico foráneo y los métodos para introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedera. La introducción puede emplear cualquiera de las técnicas existentes para ello.

Para las células bacterianas y de levaduras, esta técnica puede ser la electroporación. A la introducción puede seguir el provocar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospederas bajo condiciones propicias para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma de la célula hospedera.

Luego de su producción, los fragmentos scFv monovalente, diacuerpo y sus formas variantes equivalentes pueden ser usados en cualquiera de las formas reveladas aquí, tales como en la formulación de una composición como un fármaco, o un producto diagnóstico, tal como un juego de reactivos que comprenda además del miembro de unión específica uno o más reactivos para determinar la unión del miembro a células o a CEA no unido a células, como discutido antes.

Otros aspectos ulteriores de esta invención y sus realizaciones serán aparentes para aquellos expertos en el arte. Para que se comprenda completamente la presente invención, se proporcionan ejemplos solo para ejemplificar y no para limitar la extensión y alcance de la misma. Se hace referencia a las siguientes figuras:

#### BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: se presenta un esquema del vector pJG-1m empleado para la expresión del scFv monovalente y el diacuerpo en *E. coli*. Correspondiente a la zona del vector marcada con la barra horizontal gruesa, se presentan en la figura las secuencias de bases del sitio de clonaje para fragmentos, el péptido c-myc, el dominio de 6 histidinas y algunas regiones inter y post dominios (SEC ID No. 13).

FIGURA 2: se presentan los alineamientos de las secuencias de aminoácidos (en códigos de una letra) deducidas de las obtenidas de nucleótidos para (1) el fragmento scFv monovalente (SEC ID No. 16) y (2) el fragmento scFv divalente (diacuerpo) (SEC ID No. 17). El orden de los dominios en ambas construcciones es VH-segmento de unión-VL. Aparecen en negritas los aminoácidos de los segmentos de unión empleados en cada una de las dos moléculas.

FIGURA 3: se ejemplifica el reconocimiento de: (A) AcM CB/or-CEA.1, (B) scFv monovalente, y (C) diacuerpo, por el CEA expresado en células tumorales AsPC-1 (ATCC CRL-1682) de cultivo, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En A, B y C se observa la fluorescencia característica de membrana y del citoplasma cercano a esta. El aumento es de 200x.

FIGURA 4: se presenta el perfil cromatográfico de la digestión proteolítica del diacuerpo y la asignación de péptidos tripticos obtenidos por espectrometría de masas. Arriba: Perfil

cromatográfico de la digestión triptica del diacuerpo. Abaio: Tabla resumen de la asignación de los péptidos tripticos del diacuerpo. M/z exp: masa experimental; m/z teórica: masa teórica; Z: carga. En los espectros obtenidos no se detectaron señales que correspondieran a cisteínas incorrectamente enlazadas.

- 5 FIGURA 5: se resume la verificación de la secuencia de aminoácidos del diacuerpo (SEC ID No. 21). En letras negritas se destacan las regiones de la secuencia de la proteína que fueron verificadas por espectrometría de masas, y en *itálicas* aquellas zonas de las secuencia que no se recuperaron luego de la digestión triptica. Las zonas en negritas coinciden totalmente con la secuencia de aminoácidos deducida de las secuencia de bases del diacuerpo. También se aprecian en la porción C-terminal la secuencia del péptido c-myc y de las seis histidinas finales, que aporta el vector pJG-1m (FIGURA 1).

- FIGURA 6: se presenta el porciento de la dosis inyectada por gramo de tejido, después de 24 (barras rayadas) y 48 (barras sin rayar) horas de ser inoculadas a ratones con tumores que expresan CEA humano las siguientes moléculas radiomarcadas con <sup>125</sup>I: de izquierda a derecha y en grupos de cuatro dobles barras: (a) diacuerpo, (b) scFv, (c) F3 y (d) AcM CB/ior-CEA.1. Cada barra representa la media de los conteos recuperados de los órganos recuperados de 12 ratones. Los resultados en demuestran que entre las 24 y 48 horas, la relación de radiactividad en tumor: radiactividad en sangre se mantiene alta para el diacuerpo, el scFv, y el AcM, con los mayores valores para este último, seguido por la molécula dimérica. El F3 mostró valores muy bajos, con un comportamiento *in vivo* inadecuado que se puede correlacionar con su afinidad disminuída por el CEA.

Todos los documentos mencionados aquí son incorporados por referencia.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

- EJEMPLO 1. Amplificación por RCP, clonaje y secuencia de los dominios variables del AcM CB/ior-CEA.1

### Procedimiento (a) Purificación de ARN y amplificación de regiones variables

- Se extrajo ARN total a partir de 10<sup>6</sup> células del hibridoma de ratón CB/ior-CEA.1 (Tormo B. et al. APMIS. 97: 1073-1080, 1989) con el reactivo TriPure™ (Boehringer-Mannheim). Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) mediante el juego First-Strand cDNA Synthesis for RT-PCR (Boehringer-Mannheim), usando oligo dT como cebador.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la amplificación específica de los genes de los dominios variables de cadena pesada y ligera. Los oligonucleótidos sintéticos empleados se diseñaron sobre la base de las secuencias consenso para IgG y cadenas kappa de ratón, reportadas por Kabat E. et al.

(US Department of Health and Human Services, NIH, 1991) y experimentos conducidos anteriormente en este laboratorio (Coloma, MJ et al. Biotechniques 11: 152-156, 1991). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la RCP aparecen en la Tabla I.

- 5 Tabla I. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la RCP para la amplificación de las secuencias que codifican para los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) del AcM CB/ior-CEA.1.

**Cadena pesada.-**

Oligo 1. Péptido señal de VH. (SEC ID No. 1)

5'... GGGGATATCCACCATGTRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT...3'

- 10 Oligo 2. Región CH1 (SEC ID No. 2)

5'... AYCTCCACACACAGGRCCAGTGGATAGAC...3'

**Cadena ligera.-**

Oligo 3. Péptido señal de VL. (SEC ID No. 3)

5'... GGGGATATCCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA...3'

- 15 Oligo 4. Región Ckappa (SEC ID No. 4)

5'... ACTGGATGGTGGGAAGATGGA...3'

- 20 Para la RCP se empleó el juego PCR Core kit (Boehringer-Mannheim). Las condiciones de la RCP fueron: desnaturalización a 94°C, 1 minuto, hibridación a 55°C, 1 minuto, extensión a 72°C, 1 minuto, 25 ciclos, con 5 minutos adicionales de extensión a la temperatura ya descrita en el último ciclo, todo en un equipo MJ Research Minicycler. Los volúmenes finales de cada reacción fueron 100 µL. Todos los oligonucleótidos se emplearon a concentración final de 1 µM.

- 25 Los fragmentos de ADN amplificados, con las tallas esperadas de alrededor de 320-350 pb, se purificaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma), usando el juego QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, GmbH), y se clonaron de manera independiente en el vector pMOS (Amersham Pharmacia Biotech), diseñado para el clonaje "blunt" de fragmentos de ADN.

Procedimiento (b). Secuencia nucleotídica de los dominios variables

- 30 Para la determinación de la secuencia nucleotídica de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada clonados en el vector pMOS se utilizaron los oligos recomendados por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). La secuencia de bases se realizó mediante secuenciación automática, utilizando un equipo ALFexpress II de Pharmacia (Amersham Biosciences), y el juego "Termo Sequenase Cy 5 Dye Terminator Kit". Se seleccionaron los plasmidios pVL2 y pVH5 como representativos de las
- 35 secuencias de VL y VH, respectivamente.



**EJEMPLO 2. Ensamblaje del scFv y diacuerpo, expresión en *E. coli* y demostración de su reconocimiento de CEA humano**

**Procedimiento (a). Re-amplificación de los dominios variables y ensamblaje del scFv y diacuerpo**

Se usó la RCP para el ensamblaje, en forma de scFv y diacuerpo, de los dominios VH y VL contenidas en los plasmidios pVH5 y pVL2. Los oligonucleótidos sintéticos se diseñaron sobre la base de las secuencias de VH y VL en los plasmidios pVH5 y pVL2, de forma que incluyeran sitios de restricción convenientes para el clonaje en el vector pJG-1m e incorporaran los segmentos de unión de 14 y 5 aminoácidos necesarios para el ensamblaje del scFv monomérico y el diacuerpo (Tablas II y III).

Tabla II. Secuencias de aminoácidos de los segmentos de unión (linkers) usados para la construcción de los fragmentos scFv y diacuerpo.

ScFv.- Linker L1: EGKSSGSGSESKVD (SEC ID No. 5)

Diacuerpo.- Linker L2: GGGGS (SEC ID No. 6)

Tabla III. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la RCP para el ensamblaje del scFv y del diacuerpo.

Oligo 5. ApaL1- FR1 VH (SEC ID No. 7)

5'...TCTCACAGTGCACAGGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGG...3'

Oligo 6. Segmento de unión de 14 aminoácidos /FR4 VH (SEC ID No. 8)

5'...GTCGACTTTGGATTTCGGAGCCTGATCCTGAGGATTTACCCTCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT...3'

Oligo 7. Segmento de unión de 14 aminoácidos/FR1 VL (SEC ID No. 9)

5'...GAGGGTAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGACGACATTGTGATGACCCAGTC...3'

Oligo 8. Not I- FR4 VL (SEC ID No. 10)

5'...AAGGAAAAAGCGGCGCTTTTCAGCTCCAGCTTGGTT...3'

Oligo 9. Segmento de unión de 5 aminoácidos /FR4 VH (SEC ID No. 11)

5'...AGAGCCGCCGCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT...3'

Oligo 10. Segmento de unión de 5 aminoácidos/FR1 VL (SEC ID No. 12)

5'...GGTGGCGGCGGCTCTGACATTGTGATGACCCAGTCT...3'

Para el ensamblaje de los fragmentos, en un primer paso se realizaron RCP independientes donde se amplificaron:

1. Para los dominios que darían origen al scFv monovalente.- Reacción 1: usando el templado pVH5 con los oligonucleótidos 5 y 6 (Tabla III). Reacción 2: usando el templado pVL2 con los oligonucleótidos 7 y 8 (Tabla III).
2. Para los dominios que darían origen al diacuerpo.- Reacción 3: usando el templado pVH5 con los oligonucleótidos 5 y 9 (Tabla III). Reacción 4: usando el templado pVL2 con los oligonucleótidos 8 y 10 (Tabla III).

Las condiciones y reactivos empleados para la RCP fueron los ya descritos más arriba. Todos los oligonucleótidos se emplearon a concentración final de 1  $\mu$ M.

- 10 Para el ensamblaje del scFv se realizó una nueva RCP donde se colocaron 4  $\mu$ L de las reacciones 1 y 2, junto a los oligonucleótidos 5 y 8 (Tabla III) en concentración final de 1  $\mu$ M, y los oligonucleótidos 6 y 7 (Tabla III) en concentración final de 0.01  $\mu$ M.

Para el ensamblaje del diacuerpo se realizó una nueva RCP donde se colocaron 4  $\mu$ L de las reacciones 3 y 4, junto a los oligonucleótidos 5 y 8 (Tabla III) en concentración final de 1  $\mu$ M, y los oligonucleótidos 9 y 10 (Tabla III) en concentración final de 0.01  $\mu$ M.

- 15 Los fragmentos de ADN amplificados se detectaron como bandas mayoritarias de aproximadamente 700 pb, que se aislaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión, de forma similar a la que se describe anteriormente.

Procedimiento (b). Clonaje en el vector pJG-1m.

- 20 El vector pJG-1m es un plasmidio diseñado para la expresión de fragmentos de anticuerpos hacia el periplasma de *E. coli* (FIGURA 1). Como elementos principales tiene el promotor LacZ, un péptido señal, sitios de restricción ApaI y Not I para la inserción del gen del fragmento, un dominio codificante del péptido c-myc y una secuencia que codifica para 6 histidinas, esta última con vistas a la purificación de los productos de expresión mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC; Porath J. Prot. Expr. Purif. 3: 263-281, 1992). Las secuencias de bases del vector donde se encuentran los sitios de restricción para el clonaje del scFv en cuestión, y para aminoácidos C-terminales que se añaden al mismo aparecen en la FIGURA 1 (SEC ID No. 13).

- 30 Tanto los fragmentos de ADN correspondientes al scFv y al diacuerpo, como el vector pJG-1m, se digirieron con las enzimas de restricción ApaI y Not I (Promega), y las bandas y vector se ligaron independiente empleando T4 ADN ligasa (Promega). Los productos de la reacciones de ligazón se emplearon para la transformación de *E. coli* competentes (cepa XL-1Blue; Stratagene) mediante electroporación, y las células transformadas se plaquearon en medio sólido selectivo (LB agar, con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina) y se crecieron durante 16 horas a 37°C. Los métodos empleados se
- 35

describen en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989.

Los plásmidos recombinantes se seleccionaron después de la purificación del ADN plasmídico a partir de varias colonias (QIAGEN MiniPrep kit), y el correspondiente chequeo por digestión con las enzimas de restricción ya descritas para los productos de ligazón esperados. En los análisis de restricción se obtuvieron bandas de aproximadamente 3,5 kb, correspondientes al vector linealizado y bandas de aproximadamente 700 pb para los genes codificantes de los fragmentos de anticuerpo tipo scFv y diacuerpo.

Se secuenciaron cinco clones de cada una de las construcciones utilizando cebadores específicos diseñados que hibridan externamente a las regiones de clonaje del vector pJG-1m (Tabla IV), mediante procedimientos descritos anteriormente.

Tabla IV. Oligonucleótidos sintéticos para la secuenciación de las bases de los scFv y diacuerpo ensamblados mediante RCP y clonados en el vector pJG-1m.

Oligo 11. (SEC ID No. 14)

5'...GTTGTTCCCTTCTATTCTCAC...3'

Oligo 12. (SEC ID No. 15)

5'...CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC...3'

Las secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de bases obtenidas para el scFv monovalente (clon pJG1m-25) y el diacuerpo (clon pJG1m-18) aparecen en la FIGURA 2 (SEC ID No. 16 y SEC ID No. 17). Respecto a un scFv desarrollado anteriormente (Ayala M et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992), las secuencias de VH y VL ahora obtenidas para el nuevo scFv monovalente y el diacuerpo presentan 16 aminoácidos diferentes entre el FR1, CDR2 y FR3 del dominio VH, y 3 aminoácidos distinto entre el FR1 y FR3 del dominio VL. Estos resultados indican que los dominios variables amplificados y clonados a partir del hibridoma CB/for-CEA.1 para construir los nuevos scFv monovalente y diacuerpo pueden provenir de ARN diferentes a los utilizados en las amplificaciones para los clonajes del scFv reportado previamente. El segmento de unión del nuevo scFv monovalente es idéntico al del scFv reportado previamente. El segmento de unión del nuevo scFv divalente (diacuerpo) es diferente al del scFv obtenido previamente, pues sólo comprende 5 aminoácidos. En estos experimentos se verificaron también las secuencias de los segmentos de unión L1 y L2, que aparecen en la Tabla II.

Procedimiento (c) Comprobación de la expresión del scFv y diacuerpo en *E. coli* mediante

SDS-PAGE y Western blot.

Con los plásmidos pJG1m-25 y pJG1m-18, conteniendo la información para los dos fragmentos de anticuerpo, se transformaron de forma independiente células competentes TG1 de *E.coli*. Esta cepa permite la expresión periplasmática de la proteína heteróloga, o su salida hacia el medio de cultivo. Las bacterias transformadas se plaquearon en medio sólido selectivo y se dejaron crecer a 37°C por 16 horas. Una colonia representativa de cada una de las dos construcciones se creció en medio líquido y al alcanzar 1 DO<sub>530nm</sub> se indujo por 12 horas añadiendo 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Las células se centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y sonicación breve (segundos) para su evaluación en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Este ensayo reveló la expresión en ambos casos de proteínas del peso molecular esperado (aprox. 27 kDa), que luego se evaluaron por Western Blot utilizando como anticuerpo primario un AcM específico (9E10) contra el péptido derivado del c-myc que contiene esta proteína (1 µg/mL), seguido por anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La transferencia de las proteínas desde la SDS-PAGE a nitrocelulosa Hybond C Extra (Amersham Life Sciences) se ejecutó en un equipo de transferencia semi-seca (BioRad). En el revelado se empleó DAB (Sigma) como sustrato insoluble.

Para las dos construcciones, las proteínas recombinantes con la talla mencionada fueron identificadas con el AcM 9E10.

20 Procedimiento (d) Reconocimiento específico del CEA humano por el scFv y el diacuerpo en ELISA.

Se realizó un ensayo ELISA recubriendo placas de polivinilo (Costar, 96-well Vinyl Assay Plates) con CEA humano (Calbochem 219369), a una concentración de 1µg/mL. Luego de bloqueadas las placas con leche descremada, las muestras de periplasma bacteriano correspondientes a las dos construcciones se añadieron en diluciones de 1: 5, 1:10 y 1:20 en PBS-leche descremada 2%, e incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Se empleó el AcM 9E10 (1 µg/mL), seguido de anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma) para la detección de la unión de los fragmentos al CEA. Luego de varios lavados, se emplearon OPD (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cromógeno y sustrato para el revelado de las reacciones, y un lector LabSystems Multiskan MS para la evaluación cuantitativa de las mismas a 492nm. En el ensayo se utilizó como control positivo el AcM CB/ ior-CEA.1. Como controles negativos se emplearon fracciones periplasmáticas correspondiente a células TG1 transformadas con el vector pJG-1m sin inserto, y un AcM no relacionado. También se recubrieron placas con los siguientes antígenos irrelevantes: 10 µg/mL de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma), 10 µg/mL de ovalbúmina, 10 µg/mL de lisozima, 10 µg/mL de keyhole limpet haemocyanin (Sigma).

En todas las placas se incluyeron pozos donde sólo se colocó solución salina tamponada con fosfatos (PBS) sin antígeno (blanco). Se consideraron positivos aquellos valores de absorbancia al menos 4 veces mayores que los producidos por los controles negativos.

- 5 En estos experimentos las muestras de periplasma de las construcciones del scFv y del diacuerpo resultaron positivas en cuanto a su capacidad de reconocimiento de CEA humano adsorbido a placas de polivinilo. Estas mismas muestras fueron negativas para todos los antígenos irrelevantes.

Procedimiento (e) Reconocimiento del CEA humano asociado a células por el scFv y el diacuerpo mediante ELISA e inmunofluorescencia indirecta.

- 10 Las líneas celulares de tumores humanos LoVo (ATCC CCL-229), AsPC-1 (ATCC CRL-1682) y LS 174T (ATCC CL-188), todas que expresan CEA en cultivo, se sembraron en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar). Una vez alcanzada la confluencia, los pocillos se lavaron dos veces con PBS, escurrieron, y secaron al aire. Seguidamente se fijaron las células al plástico mediante una mezcla 1:1 (v:v) de acetona-metanol frío, por 3 minutos. Luego de varios lavados con agua destilada para eliminar residuos, las placas se emplearon como fase sólida en ensayos de ELISA donde las muestras de periplasma bacteriano correspondientes a las dos construcciones se añadieron en dilución de 1: 2, 1:8 y 1:16 en PBS-leche descremada 2%, e incubaron por a 2 horas a temperatura ambiente. Luego de varios lavados, se empleó el AcM 9E10 (10 µg/mL), seguido por anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma) para la detección de la unión de los fragmentos al CEA en las células. Se emplearon OPD (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cromógeno y sustrato para el revelado de las reacciones y un lector LabSystems Multiskan MS para la evaluación cuantitativa de las mismas a 492nm. Para el paso de lectura, los sobrenadantes se transfirieron a una placa virgen. En el ensayo se utilizó como control positivo el AcM CB/or-CEA.1. Como controles negativos se emplearon fracciones periplasmáticas correspondiente a células TG1 transformadas con el vector pJG1 sin inserto, y un AcM no relacionado. También se usó como control negativo una placa con células humanas HEK 293 (ATCC CRL-1573), que no expresan CEA. Los criterios de positividad fueron semejantes que para el ELISA descrito en el
- 25
- 30 Procedimiento anterior.

- En este experimento las muestras de periplasma de las construcciones del scFv y del diacuerpo reconocieron sólo a las células LoVo, AsPC-1 y LS 174T. Los controles negativos fueron todos negativos. Se demostró de esta forma la capacidad del scFv y del diacuerpo de identificar el CEA humano sobre células tumorales humanas que expresan este antígeno, fijadas sobre placas de poliestireno, mediante ELISA.
- 35

En otro experimento, se sembraron células LoVo, AsPC-1 y LS 174T, en placas de poliestireno de 35 mm de diámetro (Costar) y cultivaron hasta alcanzar la confluencia. Las placas se lavaron dos veces con PBS, escurrieron, dejaron secar al aire, y se fijaron las células al plástico mediante una mezcla 1:1 (v:v) de acetona-metanol frío. Luego de varios lavados con agua destilada para eliminar residuos, las placas se emplearon como fase sólida en ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Para ello se definieron zonas circulares en la superficie con células fijadas, en las cuales se incubaron de forma independiente muestras de periplasma bacteriano correspondientes a las dos construcciones, en diluciones de 1: 2, 1:4 y 1:8, en PBS-3% BSA. Se emplearon los mismos controles positivos y negativos que en el experimento del ELISA de células. La incubación se hizo a temperatura ambiente (TA) por 1 hora en cámara húmeda, seguida de varios lavados con PBS-3% BSA frío, y la adición de AcM 9E10 (10 µg/mL) a toda la monocapa por una hora a TA, también en cámara húmeda. Luego de varios lavados con PBS- 3% BSA frío, la monocapa se incubó con anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluidos 1:64 en PBS-3% BSA, por 30 minutos, en la oscuridad y cámara húmeda, se lavaron cinco veces con PBS-3% BSA, una vez con PBS y finalmente colorearon con solución de Azul de Evans por unos minutos. Las monocapas se cubrieron con PBS-10% glicerol, sellaron con láminas cubreobjeto y examinaron en un aditamento de luz fluorescente reflejada Olympus BH2-RFL, montado sobre un microscopio Olympus BHT. También se usó como control negativo placas con células humanas HEK 293. Se estableció como criterio de positividad la presencia de fluorescencia verde manzana sobre la membrana y citoplasma de las células, siempre y cuando esta no existiera con las muestras controles negativos, ni en las células humanas negativas a CEA.

En este experimento las muestras de periplasma de las construcciones del scFv y del diacuerpo reconocieron sólo las células LoVo, AsPC-1 y LS 174T. Los controles negativos fueron negativos. Se demostró de esta forma la capacidad del scFv y del diacuerpo para la identificación de CEA humano sobre células tumorales humanas que expresan este antígeno, fijadas sobre placas de poliestireno, mediante inmunofluorescencia indirecta. Un ejemplo de los resultados se muestra en la FIGURA 3.

**EJEMPLO 3.- Expresión del scFv y diacuerpo en *Pichia pastoris* y demostración de su reconocimiento de CEA humano**

Procedimiento (a) Re-amplificación del scFv y el diacuerpo y clonaje en el vector pPS7.

Los genes que codifican para el scFv y el diacuerpo se amplificaron mediante la RCP utilizando como moldes las construcciones pJG1-25 y pJG1-18, respectivamente, y oligonucleótidos diseñados para adicionar el sitio NcoI en los extremos 5' y 3' de los

genes en cuestión (Oligos 13 y 14; Tabla V), con vistas a su clonaje en el vector de expresión pPS7 de *Pichia pastoris*. El procedimiento de amplificación fue semejante al descrito anteriormente. El plasmidio pPS7 es un vector integrativo que contiene un fragmento de 1.15Kb que corresponde al promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX.1) seguido del gen que codifica para la señal de secreción de la sucrosa invertasa (sucII) de *Saccharomyces cerevisiae*, un sitio único de clonación NcoI, un fragmento de 960pb de la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (Gapt) para garantizar la terminación de la transcripción, y el gen HIS3 de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección. Además este vector contiene un fragmento de 2.1 kb, correspondiente a la secuencia 3' del gen AOX.1. Todos estos elementos están insertados en un vector pUC18 (Herrera Martínez LS et al. , EP0438200 A1).

15 Tabla V. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la RCP para la amplificación y modificación de las secuencias que codifican para las primeras bases de la VH y últimas de la VL , con vistas al clonaje del scFv y el diacuerpo en el vector pPS7, y en la secuenciación de estos clonajes.

Oligo 13. Nco 1 - bases 1 a la x de FR1 VH (SEC ID No. 18)

5'...CATGCCATGGGGAATCCGAAGTGAAGCTGGTGGAG...3'

**Oligo 14. Nco 1 – 6 histidinas (antisentido) (SEC ID No. 19)**

20 5'... CATGCCATGGATCCCGGGGTGATGGTGGTGGTGGT...3'

Oligo 15. promotor alcohol oxidasa pAOX.1 (SEC ID No. 20)

5'... GACTGGTTCCAATTGACAAGC...3'

Luego de la digestión NcoI (Promega) de las bandas amplificadas correspondientes al scFv y al diacuerpo, estas se ligaron independientemente al vector pPS7 previamente digerido con la misma enzima, y los productos de la ligazón se emplearon para transformar de forma independiente la cepa XL-1Blue de *E. coli*. Se analizaron colonias aisladas correspondientes a la transformación de la cepa con cada vector recombinante utilizando un RCP de colonias con un cebador que hibrida en el promotor (Oligo 15, Tabla V) y otro para el extremo 3' de la VL (Oligo 8, Tabla III). Se seleccionaron aquellas que resultaron contener el inserto correctamente orientado. La secuenciación de los genes clonados se realizó según el procedimiento descrito anteriormente ( EJEMPLO 1 procedimiento b), empleando el Oligo 15 (Tabla V). Las secuencias obtenidas para los dominios VH y VL de los plasmidios recombinantes pPSM2 (scFv) y pPSM3 (diacuerpo) concordaron con las anteriormente citadas en los SEC ID No. 16 y No. 17).

- Se obtuvieron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* con estos dos plasmidios mediante la electroporación de la cepa salvaje MP36 his 3 (Yong V et al. Biotechnol. Applic. 9: 55-61, 1992) con los dos plasmidios mencionados, previamente digeridos con la enzima de restricción PvuII (Promega), y seleccionando en medio mínimo deficiente de histidina.
- 5 Producto de los diferentes mecanismos de recombinación de los plasmidios recombinantes con sitios específicos en el genoma de *Pichia pastoris*, se lograron aislar para cada construcción dos tipos de fenotipos diferentes de cepas secretoras: (a) cepas cuyo gen del AOX.1 no fue afectado durante el evento de recombinación y por consiguiente crecieron en un medio con metanol y mostraron un crecimiento similar al de
- 10 la cepa salvaje (Mut+) y (b) cepas cuyo gen de AOX.1 fue reemplazado por el cassette de expresión y manifestaron un crecimiento lento en presencia de metanol (Mut s).

#### Procedimiento (b) Estudios de expresión

- Los estudios de expresión de los fragmentos de anticuerpo se realizaron partiendo de las colonias prototróficas His<sup>+</sup> crecidas en placas con medio selectivo MD (base nitrogenada de levadura, biotina, dextrosa). Se inocularon 10 mL de medio rico tamponado BMGY
- 15 (extracto de levadura, peptona, fosfato de potasio, base nitrogenada de levadura, biotina y glicerol) en tubos de 50 mL, con las colonias en cuestión y se colocaron a 28°C con rotación de 150 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron 2 unidades de D.O a 600 nm, medidas en un equipo SPECTRONIC GENESIS 2, se centrifugó a 2000 rpm, durante 10
- 20 minutos. Los precipitados celulares se resuspendieron en 10 mL de medio rico con metanol en lugar de glicerol como fuente única de carbono (BMMY). A partir de este momento y durante 96 horas se procedió a la inducción de las proteínas de interés, con la adición diaria de metanol puro hasta una concentración final de 1% en el cultivo. Como control negativo se empleó la cepa MP36his3 transformada con un vector sin inserto.
- 25 Culminado el período de cultivo las células se centrifugaron y se colectó el medio de cultivo metabolizado durante la fase de inducción, el cual se centrifugó una vez mas para su clarificación final y detección del scFv o el diacuerpo en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Este ensayo reveló la expresión en ambos
- 30 casos de proteínas del peso molecular esperado (aprox. 27 kDa), que luego se evaluaron por Western Blot utilizando el AcM 9E10, como anticuerpo primario, y anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma). Las transferencias se realizaron como descrito arriba. En el revelado se empleó DAB (Sigma) como sustrato insoluble. Para las dos construcciones, las proteínas recombinantes fueron identificadas por el AcM 9E10.
- 35 Procedimiento (c) Reconocimiento del CEA humano por el scFv y el diacuerpo en ELISA.



Se realizó un ensayo ELISA muy semejante al descrito anteriormente para el material derivado de *E.coli*, empleando similares fase sólidas, reactivos y condiciones de recubrimiento, incubación, revelado y control positivo. Las muestras de cultivo metabolizado de las cepas recombinantes inducidas se añadieron diluidas en PBS-1% de  
5 leche a razón de 100 µL/pozo, y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Como controles negativos se emplearon medios metabolizados correspondiente a la cepa MP36 his 3, y un AcM no relacionado. Se consideraron positivos aquellos valores de absorbancia al menos 4 veces mayores que los producidos por los controles negativos.

En este experimento las muestras de medios metabolizados en fase de inducción de las  
10 construcciones del scFv y del diacuerpo expresados en *Pichia pastoris* resultaron positivas en cuanto a su capacidad de reconocimiento de CEA humano adsorbido a placas de polivinilo.

Procedimiento (d) Reconocimiento del CEA humano asociado a células mediante ELISA de células e inmunofluorescencia indirecta.

15 Se realizó un ensayo ELISA muy semejante al descrito anteriormente para el material derivado de *E.coli*, empleando similares células de cultivo, condiciones de fijación, reactivos, incubación y revelado. A las placas con células LoVo, AsPC-1 y LS 174T fijadas se les añadieron las muestras del cultivo metabolizado de cepas de *P.pastoris* recombinantes inducidas, diluidas en PBS con leche descremada al 2%, e incubaron  
20 durante 2 horas a temperatura ambiente con movimiento suave. En el ensayo se utilizó como control positivo el AcM CB/ior-CEA.1. Como controles negativos se emplearon cultivos metabolizados en fase de inducción de la cepa MP36 his transformada con el vector pPS7 sin inserto, y un AcM no relacionado. También se usó como control negativo una placa con células humanas HEK 293.

25 En este experimento se demostró la capacidad del scFv y del diacuerpo de identificar de forma específica el CEA humano sobre células tumorales humanas fijadas sobre soporte de poliestireno, mediante ELISA.

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta muy semejante al descrito anteriormente para el material derivado de *E.coli*, empleando similares células de cultivo,  
30 condiciones de fijación, reactivos, incubación, revelado, montaje, observación al microscopio y criterio de positividad. A las placas con células LoVo, AsPC-1 y LS 174T fijadas, se les definieron zonas independientes en la superficie cubierta, en las cuales se aplicaron las muestras de cultivos inducidos de las cepas recombinantes correspondientes a las dos construcciones, y negativas, diluidas en PBS - 3% BSA - 0,02  
35 % de azida sódica. La incubación se hizo a temperatura ambiente (TA) por 1 hora en cámara húmeda, seguida de varios lavados con PBS frío-BSA-azida sódica, y la adición

de AcM 9E10 a toda la monocapa por 1 hora a TA, también en cámara húmeda. Luego de varios lavados con PBS 3% BSA frío, la monocapa se incubó con anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Sigma) diluidos 1:64 en PBS-3% BSA por 30 minutos en la oscuridad y cámara húmeda. Las placas se lavaron cinco veces  
5 con PBS 3% BSA, una vez con PBS y finalmente se colorearon con solución de Azul de Evans por unos minutos. Las monocapas se cubrieron con PBS-10% glicerol, sellaron con láminas cubreobjeto y examinaron en el microscopio de luz ultravioleta.

En el ensayo se utilizó como control positivo el AcM CBfor-CEA.1. Como controles negativos se emplearon el medio de cultivo inducido de MP36 his 3 transformada con el  
10 pPS7 sin inserto, y un AcM no relacionado. También se usó como control negativo una placa con células HEK 293. En este experimento las muestras de medio de cultivos inducidos de las cepas recombinantes de levadura secretoras del scFv y del diacuerpo reconocieron sólo las células LoVo, AsPC-1 y LS 174T. Los controles negativos fueron negativos.

15 Se demostró la capacidad del scFv y del diacuerpo producidos en *Pichia pastoris* para la identificación de CEA humano sobre células tumorales humanas que expresan este antígeno fijadas sobre placas de poliestireno, mediante inmunofluorescencia indirecta.

#### **EJEMPLO 4. Purificación del scFv y diacuerpo producidos en bacterias.**

Procedimiento (a) Purificación de los fragmentos scFv y diacuerpo, utilizando  
20  cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) e intercambio iónico.

Para la purificación se aprovechó la presencia del dominio de seis histidinas en la proteína recombinante, aportado por el vector pJG-1m. Estas secuencias confieren a las proteínas una afinidad muy alta por iones metálicos (por ejemplo,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ) que pueden ser quelados a diferentes soportes cromatográficos, posibilitando una purificación  
25 fácil y reproducible.

Las bacterias recombinantes obtenidas tal como descrito anteriormente se centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y sonicación breve (segundos), y posteriormente se dializó por 72 horas en el tampón de acoplamiento (Tris-HCl 20 mM, 1 M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.0). Las preparaciones de periplasma  
30 bacteriano conteniendo el scFv y el diacuerpo se aplicaron directa e independientemente a una matriz de Sefarosa-IDA- $Cu^{+2}$  (Pharmacia). Una vez acopladas las proteínas, los geles se lavaron primero con 10 veces su volumen empleando tampón de acoplamiento y seguidamente de forma similar con el tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, 1 M NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7.0) para la eliminación de proteínas contaminantes de *E. coli*. La  
35 elución del scFv y el diacuerpo se realizó con Tris-HCl 20mM, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7.0). Las muestras de los picos de elución se sometieron a una SDS-PAGE

12% para verificar la presencia de las proteínas de interés. Las fracciones eluidas conteniendo el scFv y el diacuerpo se concentraron en dispositivos UltraFree 15 (Amicon), se dializaron en una solución tampón contiendo Tris-HCl 20 mM a pH 8.7, y se sometieron a un segundo paso de purificación mediante intercambio iónico. Para ello, las muestras se aplicaron a una columna Mono Q (Pharmacia), y eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl, desde 0 a 1 M. Las muestras de los picos colectados se chequearon por SDS-PAGE 12 %. Se verificó la presencia del scFv y diacuerpo a las tallas esperadas (aproximadamente 27 kDa). La pureza final alcanzada para las dos moléculas fue semejante y cercana al 95%, estimada mediante SDS-PAGE y tinción de plata. Los picos de scFv y diacuerpo puros se concentraron en dispositivos UltraFree 15 (Amicon) hasta 2 mg/mL. Se verificó la actividad biológica de las preparaciones purificadas mediante ELISA, siguiendo un procedimiento semejante al descrito anteriormente en esta invención. Todas las muestras se conservaron a 4°C.

Procedimiento (b) Análisis del scFv y el diacuerpo mediante gel filtración

Se estudiaron mediante cromatografía de tamiz molecular el scFv y el diacuerpo purificados tal como en el procedimiento anterior, para determinar la homogeneidad de las muestras y la presencia de multímeros. Para ello se empleó Superdex 200 (Pharmacia) y un proceso convencional de filtración en gel mediante un equipo de HPLC. Se determinó que el scFv se concentró en un pico mayoritario de aproximadamente 27kDa, correspondiente a una forma monomérica. El diacuerpo apareció de manera mayoritaria con una talla de aproximadamente 45kDa, que se correspondiente con una forma dimérica.

**EJEMPLO 5. Caracterización del diacuerpo mediante digestión proteolítica y espectrometría de masas.**

El diacuerpo purificado se dializó durante toda la noche a 4 °C contra una solución tampón de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  al 1%, pH=8.3, que contenía Urea a una concentración de 2 mol/L. La proteína dializada se digirió con tripsina grado secuencia (Promega) a una relación enzima:sustrato 1:50 durante 4 horas a 37 °C. La digestión proteolítica se detuvo al acidificar con igual volumen de una solución acuosa de ácido trifluoracético al 1% y se guardó a -20 °C hasta el momento del análisis por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas (LC-MS).

Las digestiones tripticas se separaron por cromatografía de fase reversa en un cromatógrafo líquido AKTA Basic (Amershan Pharmacia Biotech) utilizando un gradiente lineal desde 0% hasta 80% de la solución B en 100 minutos. Las soluciones utilizadas para generar el gradiente fueron: A:  $\text{H}_2\text{O}$  / TFA 0.05 % y B: Acetonitrilo / TFA 0.05 %.

Las fracciones obtenidas durante la digestión proteolítica se analizaron por espectrometría de masa utilizando la ionización por electrospray (ESI-MS), al conectar en línea al sistema cromatográfico un espectrómetro de masas LC-MS híbrido con geometría ortogonal QTOF-2 (Micromass Ltd.). Durante la medición de LC-MS los espectros de masas se adquirieron desde 350 hasta 1800 en 0.98 segundos y utilizando 0.02 segundos entre cada uno de los barridos. El espectrómetro de masas se calibró con una solución salina compuesta por una mezcla de yoduro de sodio y cesio. Los voltajes empleados en el cono y el capilar fueron de 50 y 3000 volts, respectivamente. Los espectros se procesaron mediante el paquete de programas MassLinx v 3.5 (Micromass Ltd).

En la FIGURA 4 y su Tabla adjunta se aprecian el perfil cromatográfico de la digestión triptica del diacuerpo y el resumen de la asignación de los péptidos tripticos del diacuerpo. En los espectros ESI-MS obtenidos no se detectaron señales que correspondieran a las cisteínas incorrectamente enlazadas, apreciándose esto de los resúmenes de las fracciones 8 y 12 de la Tabla adjunta a la FIGURA 4, que contienen a los péptidos ( $^{20}\text{Phe-Arg}^{31}$ )-S-S-( $^{87}\text{Ser-Arg}^{97}$ ) y ( $^{143}\text{Val-Lys}^{148}$ )-S-S-( $^{186}\text{Ile-Lys}^{228}$ ) enlazados por puentes de disulfuro (-S-S-) entre las cisteínas 22 y 95, y 147 y 212, respectivamente.

De los péptidos analizados por ESI-MS se pudo obtener el 92% de la secuencia del diacuerpo en una sola digestión proteolítica (FIGURA 5). En esta secuencia hay una total coincidencia con la secuencia de aminoácidos deducida de las secuencia de bases realizadas a los dominios VH y VL (SEC ID No. 16 y 17) amplificados por RCP a partir de ARN total del hibridoma productor del AcM CB/lor-CEA.1, del segmento de unión de 5 aminoácidos (SEC ID No. 10), y en la porción C-terminal, de la secuencia del péptido c-myc y las seis histidinas finales, que aporta el vector pJG-1m (FIGURA 2).

#### 25 EJEMPLO 6. Estudios de reconocimiento del CEA deglicosilado.

EL CEA humano (Calbochem) se desglicosiló enzimáticamente con la endoglicosidasa PNGasa F (New England Biolabs) específica para N-glicosilación. El CEA se disolvió en buffer fosfato 20 mM pH 7.8 y se desnaturalizó con SDS y 2-mercaptoetanol a 100°C por 5 min. Posteriormente se adicionó detergente NP-40 y 1 µL de PNGasa F a 37°C por 2 horas. Las muestras control y la desglicosilada se analizaron en SDS-PAGE con tinción por azul coomasie observándose una disminución considerable de la talla molecular (alrededor del 50%) después de la digestión con la endoglicosidasa. Se realizó un Western blot empleando (a) AcM CB/lor-CEA.1, (b) el fragmento scFv divalente (diacuerpo) purificado o (c) un antisuero anti-CEA humano obtenido en ratón, como anticuerpos primarios, seguidos por anticuerpos policlonales anti-Fab del AcM CB/lor-CEA.1 conjugados a peroxidasa de rábano picante para (a) y (b), y anti-IgG de ratón

conjugados a peroxidasa de rábano picante para (c). La transferencia y revelado fue semejante a como fue descrito anteriormente en esta invención para los Western blots. El AcM CB/ior-CEA.1 y el diacuerpo sólo reconocieron el antígeno no deglicosilado. El antisuero policlonal reconoció al CEA antes y después de deglicosilado.

- 5 Se analizaron muestras de CEA humano nativo mediante un sistema Dot Blot con reconocimiento por lectinas específicas. Las lectinas empleadas fueron la aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) y la aglutinina de *Maackia Amurensis* (MAA) específicas a ácido sialico terminal enlazados alfa 2,6 y alfa 2,3, respectivamente. Las lectinas empleadas en estos experimentos estaban conjugadas a Digoxigenina, que es identificada por un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina. Las muestras positivas a la interacción lectina-oligosacárido se revelaron por reacción con sustrato específico a la fosfatasa (una mezcla de cloruro de 4-nitro azul tetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato). En este experimento se utilizó como control positivo a ambas lectinas la Fetuina. El CEA nativo fue reconocido por SNA y no por la MAA, lo que indicó una alta prevalencia de ácidos sialicos terminales enlazados alfa 2,6.

- 15 Se procedió entonces a la digestión del CEA humano con la enzima NANAsa II, una exoglicosidasa (sialidasa) capaz de hidrolizar los ácidos sialicos terminales alfa 2,6. A esto siguió la separación de los productos de la digestión en SDS-PAGE, y el estudio del reconocimiento de los mismos mediante Western Blot, empleando como anticuerpos primarios el AcM CB/ior-CEA.1 y un antisuero anti-CEA humano obtenido en ratón. Los resultados obtenidos arrojaron reconocimiento del control de CEA nativo por las dos muestras, mientras que sólo hubo reconocimiento del CEA digerido con NANAsa II por parte del antisuero anti-CEA en ratón.

#### 25 **EJEMPLO 7. Estudio inmunocito e histoquímico en tejidos humanos normales y tumorales.**

- El estudio en tejidos se realizó en muestras seleccionadas de archivos de tejidos tumorales y tejidos normales, provenientes de material de autopsias. Se empleó un panel mínimo de tejidos para verificar el patrón de reconocimiento ya descrito para el AcM CB/ior-CEA.1 (Tormo B et al. APMIS 97: 1073-1080, 1989). Los especímenes incluyeron: carcinomas de pulmón, piel, mama, cervix, esófago y riñón, adenocarcinomas de colon, próstata, páncreas, vesícula, intestino delgado y estómago, tumores de origen neural, hematopoyético y sarcomatoso, así como mucosa colónica normal y tejidos normales como hígado, riñón, pulmón, testículos, bazo y páncreas, incluyéndose además células de la sangre. El estudio se realizó siguiendo los procedimientos antes reportados (Tormo B et al. APMIS 97: 1073-1080, 1989), con algunas variaciones. Los especímenes de tejido se fijaron en solución de formalina al 10% tamponada, de deshidrataron, aclararon y

embebieron en parafina de acuerdo a procedimientos de rutina. La histopatología se evaluó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se emplearon secciones consecutivas de los bloques evaluados histopatológicamente para la tinción por la técnica de inmunoperoxidasa.

- 5 Para ello, las secciones desparafinas y rehidratadas se trataron con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutos para bloquear la peroxidasa endógena, se lavaron en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), e incubaron con las muestras, diluidas estas en PBS-1% seroalbúmina bovina (tampón de dilución), por 1 hora. Seguidamente las láminas se incubaron por 30 minutos con una dilución 1:100 de anticuerpo IgG policlonal de conejo  
10 biotinilado, obtenido por inmunización con el Fab del CB/ior-CEA.1, y finalmente por igual tiempo con una dilución 1:500 de un complejo peroxidasa-estreptavidina (Amersham).

Las muestras examinadas fueron:

- (a) El AcM CB/ior-CEA.1 (control positivo) a concentración de 20 µg/mL
- (b) El scFv purificado de *E. coli*, tal como descrito en el EJEMPLO 4 procedimiento  
15 (a), a concentraciones de 50 µg/mL
- (c) El diacuerpo purificado de *E. coli*, tal como descrito en el EJEMPLO 4 procedimiento (a), a concentraciones de 50 µg/mL
- (d) El scFv obtenido anteriormente y denominado "F3" en estos Ejemplos (Ayala et al. Biotechniques 13: 790-799, 1992; Pérez L et al. Applied Biochem. Biotechnol. 24: 79-  
20 82, 1996), purificado y a concentraciones de 50 y 100 µg/mL

Todas las diluciones se hicieron en el tampón de dilución y las incubaciones a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Entre cada paso se realizaron 3 lavados de 1 minuto con tampón de dilución o PBS. La reacción de inmunoperoxidasa se desarrolló mediante una incubación de 5-10 minutos con una solución que contenía 3 mg de 3-3  
25 diaminobencidina, 5 mL de PBS y 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Las láminas se contratiñieron con hematoxilina de Mayer. La reacción color café característica se registró como: negativa, o positiva en tres niveles de intensidad ascendente (1+, 2+, 3+). En cada lámina se realizó el marcaje con la muestra en cuestión, y en una zona adyacente con el tampón de dilución como control negativo.

- 30 Para los estudios en células de la sangre, se eliminaron primero los eritrocitos, y las células blancas remanentes se aplicaron sobre láminas portaobjetos recubiertas de gelatina, y se fijaron con acetona:metanol 1:1 (v:v). El resto de la técnica se desarrolló básicamente como descrito arriba.

En la Tabla VI se resumen los resultados obtenidos, según el tejido estudiado. Los  
35 tejidos normales estudiados (hígado, riñón, pulmón, testículos, sangre, bazo, páncreas)

- no fueron identificados por los fragmentos ni por el AcM. En el caso de la mucosa colónica, y coincidentemente con lo obtenido antes para el AcM CB/ior-CEA.1, el scFv F3, y los nuevos scFv y diacuerpo reaccionaron exclusivamente con los productos de secreción luminal y en zonas apicales de algunas glándulas. La intensidad de la reacción en el caso de scFv F3 fue menor, aspecto este que también se vio luego para varios tumores. En el caso de las células de la sangre, el AcM, y el scFv y el diacuerpo no demostraron reactividad con linfocitos y neutrófilos normales lo que sugiere que no existe un nivel importante reactividad cruzada con el antígeno NCA. Por el contrario, el scFv F3 manifestó un ligero reconocimiento de estas células.
- 10 El AcM, el scFv y el diacuerpo reaccionaron con la mayoría de los tumores de origen gastrointestinal, y se observó el marcaje fuerte en la mayoría de los casos tanto en la superficie apical de las células tumorales como en el citoplasma. Ninguna de estas muestras marcaron tumores de origen hematopoyético, sarcomatoso, u otros derivados de epitelio, excepto un carcinoma de mama canalicular y un carcinoma a células grandes
- 15 de pulmón. En los casos de adenocarcinomas de colon bien diferenciados el marcaje fue intenso en la zona apical del citoplasma y en los productos de secreción lumbinales, mientras que en los moderadamente y pobremente diferenciados el marcaje se observó en todo el citoplasma. Excepto en unas muy pocas muestras, las intensidades de tinción fueron muy similares para estas tres moléculas.
- 20 En el caso del F3, se observó una disminución general de la intensidad de tinción, a pesar de que se ensayaron en algunas ocasiones concentraciones dos veces mayores que las empleadas para el scFv y el diacuerpo. La baja intensidad de la tinción puede haber provocado que algunas muestras identificadas por los demás anticuerpos no fueran reconocidas por el F3.
- 25 Tabla VI. Estudio inmunocito e histoquímico con diferentes anticuerpos.

Tejidos	scFv F3	scFv	Diacuerpo	CB/ior-CEA.1
<b>Normales:</b>				
pulmón	0/2	0/2	0/2	0/2
timo	0/2	0/2	0/2	0/2
riñón	0/2	0/2	0/2	0/2
hígado	0/2	0/2	0/2	0/2
bazo	0/2	0/2	0/2	0/2
testículo	0/2	0/2	0/2	0/2
colon	2/2 (a)*	2/2*	2/2*	2/2*
sangre	0/2 (b)	0/2	0/2	0/2
<b>Tumores:</b>				
ADC estómago	1/2 (a)	2/2	2/2	2/2
ADC páncreas	1/3 (a)	2/3	2/3	2/3
ADC vesícula	0/1	1/1	1/1	1/1
Ca esófago	0/1	0/1	0/1	0/1
ADC intestino	1/2 (a)	2/2 (a)	2/2	2/2

Ca pulmón (células grandes)	1/1 (a)	1/1	1/1	1/1
ADC colon (BD, MD, PD)	5/6 (a)	6/6(c)	6/6	6/6
Ca mama	0/1	1/1	1/1 (a)	1/1
ADC próstata	0/2	0/2	0/2	0/2
Ca cervix	0/2	0/2	0/2	0/2
Ca riñón	0/1	0/1	0/1	0/1
Ca piel	0/1	0/1	0/1	0/1
Linfoma HDG	0/1	0/1	0/1	0/1
Linfoma no-HDG	0/1	0/1	0/1	0/1
Rabdomiosarcoma	0/1	0/1	0/1	0/1
Liposarcoma	0/1	0/1	0/1	0/1

**Nota:** Los números de la Tabla representan los casos de tinción positiva/casos totales estudiados.

- De no existir paréntesis, las intensidades de tinción en los positivos fueron de entre 2+ y 3+; Ca: carcinoma; ADC: adenocarcinoma; HDG: Hodgkin; BD: bien diferenciado; MD: medianamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado. (\*): el marcaje aparece circunscrito a los productos de secreción luminal y a zonas apicales de algunas glándulas; (a): los casos positivos presentaron tinciones de intensidad clasificables como 1+; (b) reconocimiento de linfocitos y eosinófilos con intensidad clasificable como 1+; (c) 2 de los 6 casos positivos presentaron tinciones de intensidad clasificable como 1+.

#### 10 EJEMPLO 8. Determinación de la constante de afinidad

- Para la determinación de la constante de afinidad se utilizó un método de ELISA no competitivo (Beatty JD et al. J. Immunol Meth. 100: 173-184, 1987) basado en la ley de acción de masas. La constante de afinidad  $K_{aff}$  es igual a  $[AgAb]/[Ag][Ab]$ , donde AgAb es el complejo antígeno anticuerpo en L/mol ( $M^{-1}$ ),  $[Ag]$  es la concentración de antígeno libre (mol), y  $[Ab]$  es la concentración de anticuerpo libre (mol).

- Se emplearon cuatro diluciones dobles seriadas de CEA humano (Calbochem) en el recubrimiento de las placas de ELISA de polivinilo (Costar). Las placas se bloquearon utilizando PBS-leche descremada al 1%. Las muestras (scFv F3, scFv, diacuerpo, AcM CB/ior-CEA.1, todos purificados) se aplicaron a las placas a varias concentraciones. Luego de lavados, los pocillos correspondientes a las tres primeras muestras se incubaron con el AcM 9E10 (10  $\mu g/mL$ ), mientras que en aquellos correspondientes al CB/ior-CEA.1 se empleó solución de bloqueo. En el siguiente paso se añadió un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma), en dilución 1:2500 durante 1 hora, a 37°C. El sustrato empleado fue OPD y se la reacción se desarrolló durante 15 minutos. La lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm en un equipo LabSystems Multiskan MS.

Los valores de densidad óptica (DO) para cada caso se plotearon en el eje de las ordenadas (y), reflejándose en el eje de las abscisas (x) la concentración expresada en



ng/mL en una escala de logaritmo base 10. Se tomó la DO 100 como aquella a la cual la señal se mantenía al máximo. Para cada curva se calculó la mitad de la DO 100 (DO 50). Se determinaron los valores de concentración de la muestra a DO 50 para cada curva, y se realizaron los cálculos de la afinidad mediante la siguiente formula:  $K_{aff} = (n-1)/2(n)$ ,  
 5 donde  $n = [Ab']t/[Ab]t$ .  $[Ab']t$  es el valor de concentración de la muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración mayor de antígeno a comparar y  $[Ab]t$  es el valor de concentración de muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración menor de antígeno a comparar. Se realizaron las seis determinaciones de afinidad posibles para las 4 curvas obtenidas, estimándose la  $K_{aff}$  final como el promedio  
 10 de estos.

La Tabla VII refleja los valores de  $K_{aff}$  calculados para cada una de las variantes ensayadas. El scFv posee una  $K_{aff}$  de  $(5.0 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ , mas de un orden y medio de magnitud mayor que la obtenida para el F3 ( $K_{aff} = (9.2 \pm 0.8) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ ). Este último valor se corresponde básicamente con el calculado para el F3 a partir de mediciones  
 15 efectuadas por un procedimiento diferente (Pérez L et al. Applied Biochem. Biotechnol. 24: 79-82, 1996). El diacuerpo posee una  $K_{aff}$  de  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$ , mientras que para el AcM CB/ior-CEA.1 el valor de  $K_{aff}$  fue de  $(6.1 \pm 0.5) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$ .

Tabla VII. Valores de constante de afinidad calculados para los desarrolladas

Muestra ensayada	$K_{aff} (\text{L mol}^{-1})$
AcM CB/ior-CEA.1	$(6.1 \pm 0.5) \times 10^{10}$
Diacuerpo	$(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10}$
scFv	$(5.0 \pm 0.4) \times 10^9$
ScFv F3	$(9.2 \pm 0.8) \times 10^7$

$K_{aff}$ : constante de afinidad, calculada como promedio de seis determinaciones  $\pm$  la desviación  
 20 estándar (entre paréntesis).

**EJEMPLO 9.- Determinación del reconocimiento específico *in vivo* de fragmentos y anticuerpo marcados con  $^{125}\text{I}$ , en ratones C57Bl/6 portadores del tumores inducidos por la inoculación de las células B16-CEA13.**

25 Para la determinación del reconocimiento específico *in vivo* de los fragmentos de anticuerpo, se marcaron con  $^{125}\text{I}$  (Amersham, UK) mediante el método de Iodogen (Fraker PJ, Speck JC Jr. Biochem Biophys Res Comm 80:849-857, 1978) las siguientes moléculas:

- (a) scFv purificado de *E. coli* ; (actividad específica 1.1 MBq/5  $\mu\text{g}$ )
- 30 (b) diacuerpo purificado de *E. coli* ; (actividad específica: 1.2 MBq/5  $\mu\text{g}$ )
- (c) AcM CB/ior-CEA.1; (actividad específica: 1.8 MBq/5  $\mu\text{g}$ )

(d) ScFv F3, purificado (Ayala et al. *Biotechniques* 13: 790-799, 1992; Pérez L et al. *Applied Biochem. Biotechnol.* 24: 79-82, 1996) (actividad específica: 1.0 MBq/5 µg).

Los productos radiomarcados se analizaron en cromatografía de capa delgada para determinar la incorporación a proteína, encontrándose valores de entre 95 y 98% de la radiactividad. La capacidad de los productos radiomarcados para detectar CEA se ensayó en un sistema donde se recubrieron inmunotubos de poliestireno con CEA (5 µg/mL; Calbochem), se bloquearon, y se les añadieron muestras de los productos radiomarcados, ajustadas a las cantidades de anticuerpo que podían ser atrapadas por esta fase sólida. Luego de la incubación y el lavado se determinó que el 80, 79, 83, y 81% de la radiactividad se atrapaba por la fase sólida, respectivamente, para las muestras (a)-(d) descritas arriba, demostrando que el procedimiento de radiomarcaje no afectó sensiblemente la actividad biológica de los anticuerpos.

Para estudiar la biodistribución se formaron 4 grupos de animales, cada uno con 12 ratones C57Bl/6 (CENPALAB, Cuba). Los animales se inocularon con  $1 \times 10^6$  células B16-CEA13/animal, por vía intra-axilar. Los tumores se hicieron visibles y palpables (aproximadamente 0.3-0.5 g) a los 7 días, luego de lo cual los ratones se inyectaron por la vena de la cola con el producto radiomarcado en cuestión, y se sacrificaron a las 12, 24 y 48 horas, removiéndose quirúrgicamente el tumor y los siguientes tejidos normales: bazo, hígado, riñón, intestino, músculo, médula y sangre. La acumulación de radiactividad se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido. La calibración se realizó mediante una muestra estándar de la dosis inyectada. La radiactividad se determinó empleando un contador de centelleo gamma.

Las células B16-CEA13 empleadas en estos experimentos se obtuvieron mediante la transfección de un gen que codifica para los dominios extracelulares del CEA humano, clonado en el vector pDisplay™ (Cat. No. V660-20, Invitrogen). El gen se obtuvo por RCP a partir de ARN extraído de células CRL-1682, con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia publicada para el CEA humano. El plasmidio recombinante pDisplay-CEA se purificó y transfectó a células de melanoma B16-F10 (ATCC CRL-6475) de ratón C57Bl/6 empleando Lipofectamine PLUS™ (Gibco-BRL) y 5 µg de ADN por transfección. La selección de los transfectantes estables se realizó con 4.0 mg/mL de sulfato de geneticina (G418; Gibco-BRL) por 14 días, luego de lo cual las células de cultivo sobrevivientes se clonaron por dilución limitante y aquellos clones que expresaban CEA humano en su superficie se identificaron mediante inmunofluorescencia indirecta, empleando el AcM CB/ior-CEA.1 como anticuerpo primario y anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con FITC (Sigma) para el revelado. Se encontró que un 73% de los clones presentaban más del 80% de sus células con fluorescencia de membrana específica, indicando que

exponían el CEA humano correctamente foldeado y glicosilado en su superficie. Como controles se emplearon las células B16-F10 sin transfectar. Las réplicas de los clones seleccionados como positivos mediante inmunofluorescencia indirecta se multiplicaron e inyectaron de forma independiente a ratones C57Bl/6, a razón de  $1 \times 10^6$  células por animal, por la vía intra axilar. De los 10 clones que dieron origen a tumores, se escogió aquel con las características de crecimiento más rápido y progresivo, que se denominó B16-CEA13, para los experimentos que aquí se reportan.

La FIGURA 6 muestra los porcentos de radiactividad recuperada por tejido estudiado, a los diferentes tiempos (respecto al total inyectado), y la relación radiactividad en el tumor:radiactividad en sangre. Los resultados recogidos en la Tabla VIII demuestran que entre las 24 y 48 horas, la relación de radiactividad en tumor:radiactividad en sangre se mantiene alta para el diacuerpo, el scFv, y el AcM, con los mayores valores para este último, seguido por la molécula dimérica. El scFv F3 obtenido anteriormente mostró valores muy bajos, con un comportamiento *in vivo* inadecuado que se puede correlacionar con su afinidad disminuída por el CEA.

Tabla VIII. Relación radiactividad en tumor:radiactividad en sangre para ratones C57Bl/6 trasplantados con el melanoma de ratón B16-CEA13, que expresa CEA humano. Los valores corresponden luego de 24 y 48 horas de inyectados los animales con las diferentes moléculas radiomarcadas con  $^{125}\text{I}$ . Cada relación se calculó a partir de los valores medios derivados de los tejidos recuperados de 12 ratones.

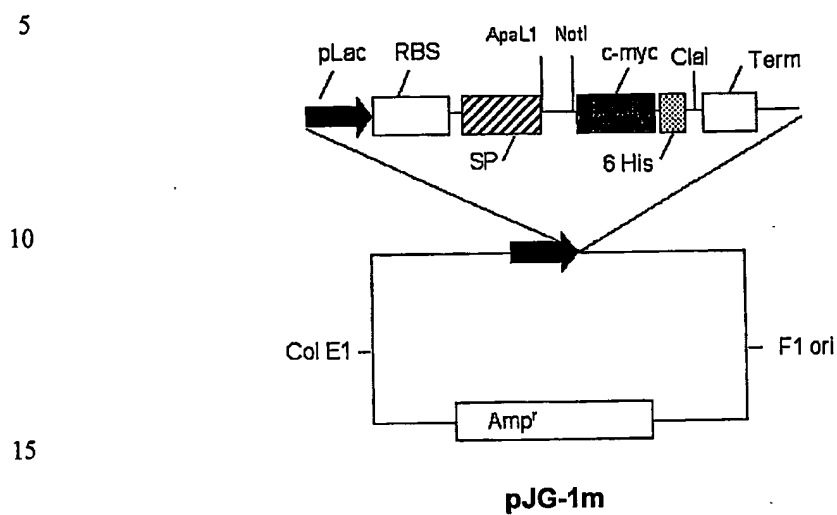
Molécula	24 horas	48 horas
scFv	43.60	53.50
diacuerpo	47.10	61.17
ScFv F3	1.79	2.62
AcM CB/ior-CEA.1	51.70	71.30

**REIVINDICACIONES****FRAGMENTOS DE ANTICUERPO ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO HUMANO (CEA)**

- 5 1. Un fragmento de anticuerpo tipo scFv monomérico obtenido a partir del ARN extraído del hibridoma productor del AcM CB/ior-CEA.1 específico para al antígeno carcinoembrionario (CEA) humano soluble, adsorbido a superficies sólidas, o presente en células, con una constante de afinidad por el CEA de  $(5.0 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$  y un reconocimiento por dicho antígeno dependiente de la conservación de la  
10 glicosidación del mismo.
2. Un fragmento de anticuerpo tipo scFv monomérico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque su secuencia aminoacídica es la referida en SEC ID No 16.
3. Un fragmento de anticuerpo tipo scFv divalente (diacuerpo) obtenido a partir del ARN extraído del hibridoma productor del AcM CB/ior-CEA.1 específico para al antígeno  
15 carcinoembrionario (CEA) humano soluble, adsorbido a superficies sólidas, o presente en células, con una constante de afinidad por el CEA de  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$  y un reconocimiento por dicho antígeno dependiente de la conservación de la glicosidación del mismo.
4. Un fragmento de anticuerpo tipo scFv divalente (diacuerpo) de acuerdo con la  
20 reivindicación 3, caracterizado porque las secuencia aminoacídica es la referida en SEC ID No. 17.
5. Fragmentos de anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizados porque son empleados para la identificación de células tumorales que expresen CEA humano.
- 25 6. Fragmentos de anticuerpos recombinantes o sintéticos específicos para CEA humano caracterizados porque comprenden las secuencias aminoacídicas de dominios variables VH y VL reportadas en SEC ID 16 y SEC ID 17, unidas artificialmente en forma de fragmentos Fab y otras variantes de scFv, anticuerpos biespecíficos, o fusionados a dominios activos desde el punto de vista biológico o  
30 bioquímico.
7. Fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la reivindicaciones 1 a la 6 caracterizados porque son producidos en bacterias y levaduras recombinantes, en otros microorganismos recombinantes, en células de mamíferos o insectos transfectadas, o en organismos modificados genéticamente.

8. Fragmentos de anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a la 7 caracterizados porque adicionalmente contienen una marca radiactiva o detectable por otro método, o un agente químico o biológico con potencial antitumoral.
9. Composición farmacéutica que contiene fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las  
5 reivindicaciones 1 a la 8, para el tratamiento de tumores humanos que expresan CEA.
10. Composición farmacéutica que contiene fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 8, para la radiolocalización *in vivo* de tumores humanos que expresan CEA mediante técnicas de imágenes.
- 10 11. Reactivo para el diagnóstico *in vitro* o *ex vivo* que contiene fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 8, para la detección de CEA humano unido o no a células.
12. Células que expresan fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las reivindicaciones 1  
15 a la 8, obtenidas mediante la manipulación genética por vía del ADN recombinante, siendo estas células bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos, o células vegetales.
13. Organismos multicelulares que expresan fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 8, obtenidos mediante la manipulación genética por vía del ADN recombinante, siendo estos organismos animales transgénicos o plantas  
20 transgénicas.
14. Vectores que codifican para fragmentos de anticuerpos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 8, obtenidos mediante la manipulación genética por vía del ADN recombinante, siendo estos vectores plásmidos o secuencias capaces de integrarse en células hospederas.

FIGURA 1.



20

Final del péptido señal (SP) y sitios de restricción ApaL1 – NotI y dos codones extra:

CCTTTCTATTCTCACAGTGACAGGAAATCAAAGCGGCCGCAGGGTCC

Péptido c-myc y un codon extra:

25 GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTCC

Dominio de 6 histidinas (6 His) y dos codones de parada:

CATCATCATCACCATCACTAATAA

30

BEST AVAILABLE COPY

FIGURA 2.

## 5 (1) Fragmento scFv monovalente (SEC ID NO. 16):

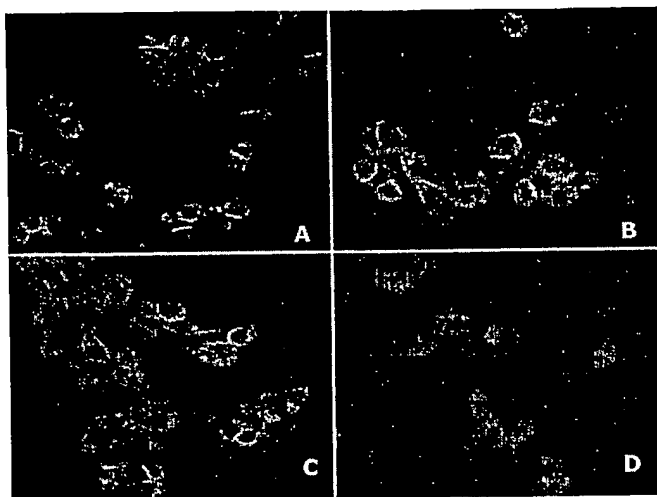
E V K L V E S G G D L V K P G G S L K F S C A A S G F P F N R Y A  
M S W V R Q T P E K R L E W V A F I S S D G I A Y Y A D S V K G R  
F T I S R D N A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R V Y  
Y Y G S S Y F D Y W G Q G T T L T V S S E G K S S G S G S E S K V  
10 D D I V M T Q S P K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N A G T N  
V A W Y Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S S R N S G V P D R I T G S  
G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P L V T  
F G A G T K L E L K

## 15 (2) Fragmento scFv divalente (diacuerpo) (SEC ID NO. 17):

E V K L V E S G G D L V K P G G S L K F S C A A S G F P F N R Y A  
M S W V R Q T P E K R L E W V A F I S S D G I A Y Y A D S V K G R  
F T I S R D N A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R V Y  
Y Y G S S Y F D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S D I V M T Q S P  
20 K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N A G T N V A W Y Q Q K P G  
Q S P K A L I Y S A S S R N S G V P D R I T G S G S G T D F T L T  
I S N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P L V T F G A G T K L E L  
K

25

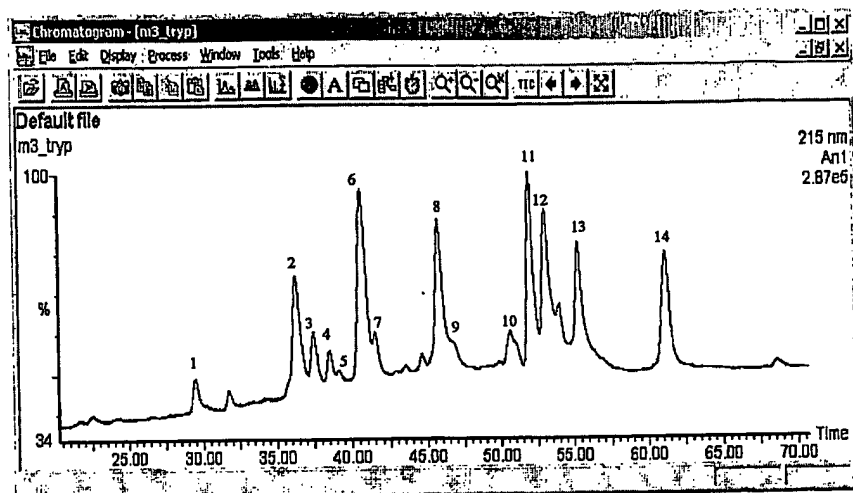
FIGURA 3.



BEST AVAILABLE COPY



FIGURA 4.

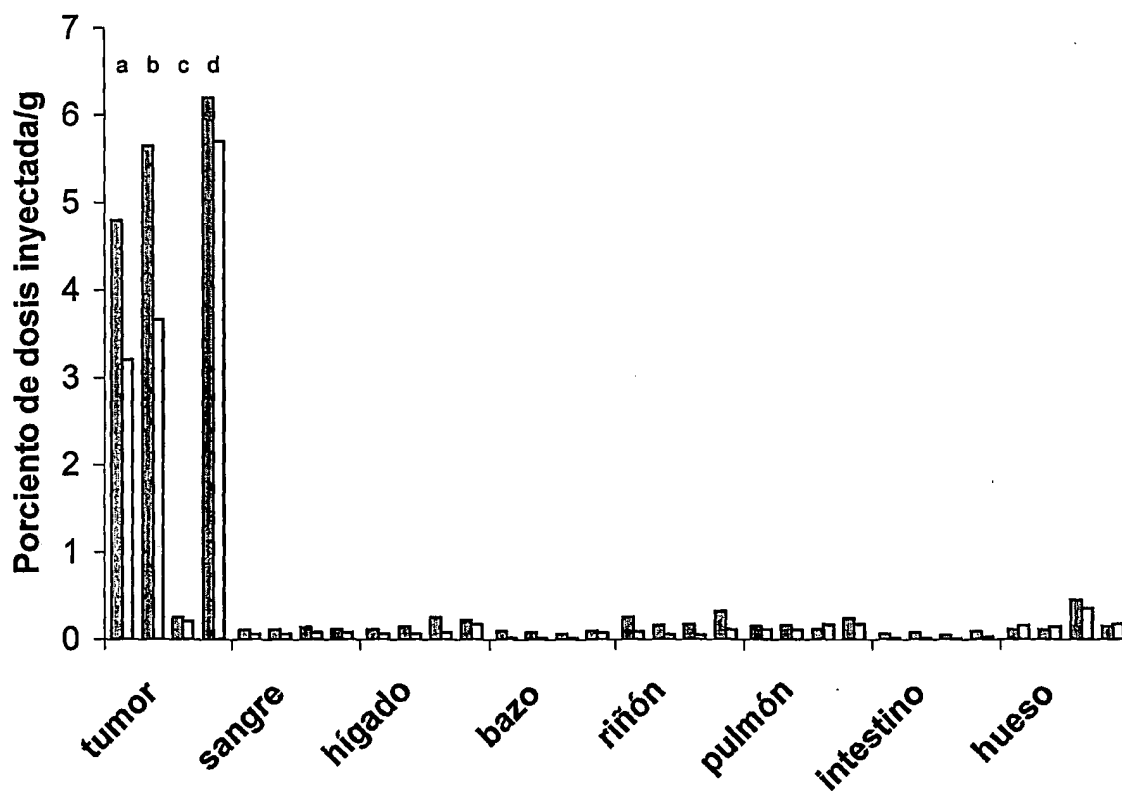


Pico #	m/z exp	m/z teórica	Z	Error absoluto	Asignación
1	744.38	744.36	1	0.02	179-185
2	502.33	502.32	1	0.01	229-232
	921.44	921.42	2	0.02	241-255
3	999.48	999.45	1	0.03	134-142
4	623.34	623.34	1	0.00	67-71
5	967.51	967.51	1	0.00	170-178
6	1130.55	1130.55	2	0.00	149-169
	778.43	778.43	2	0.00	4-19
7	833.40	833.39	2	0.01	149-163
8	870.70	870.69	3	0.01	(20-31)-S-S-(87-97)
9	912.45	912.43	1	0.02	32-38
10	669.38	669.36	2	0.02	76-86
	894.48	894.47	1	0.01	76-82
11	1291.60	1291.59	3	0.01	98-133
12	1311.65	1311.62	4	0.03	(143-148)-S-S-(186-228)
13	1195.61	1195.60	2	0.01	(44-64)
14	1117.57	1117.55	2	0.02	(45-64)

FIGURA 5.

EVKLVESGGDLVKPGGSLKFSCAASGFNFNRYAMSWVRQTPEKRLEWVAFISSDGIAYYADSVKGRF  
 TISRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCARVYYYGSSYFDYWGQGTTLVSSGGGGSDIIMTQSPKFN  
 STSVGDRVSVTCKASQNAGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASSRNSGVPDRITGSGSGTDFLTISNV  
 QSEDLAEYFCQQNSYPLVTFGAGTKLELK AAAGSEQKLISEEDLNSHHHHHH

5 FIGURA 6.



## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

5 <120> FRAGMENTOS DE ANTICUERPO ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO  
CARCINOEMBRIÓNARIO HUMANO (CEA)

<130> diabody

10 <140> 01  
<141> 2002-04-03

<160> 21

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 39  
<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

25 <400> 1  
ggggatatcc accatgract tcgggytgag ctkgggtttt 39

<210> 2  
<211> 29  
<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

35 <400> 2  
ayctccacac acaggrccag tggatagac 29

40 <210> 3  
<211> 40  
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 3

50 ggggatatcc accatggagw cacakwtca ggtctttrta 40

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA

55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

60

<400> 4  
actggatggt gggaagatgg a 21

5 <210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: linker I

<400> 5  
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp  
15 1 5 10

<210> 6  
<211> 5  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: linker II

25 <400> 6  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

30 <210> 7  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 7  
40 tctcacagtg cacaggaagt gaagctggtg gagtctggg 39

<210> 8  
<211> 63  
45 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

50 <400> 8  
gtcgactttg gattcggagc ctgacacctga ggatttacc tctgaggaga ctgtgagagt 60  
ggt 63

55 <210> 9  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 9  
gagggtaaat cctcaggatc aggctccgaa tccaaagtcg acgacattgt gatgacccag 60  
5 tc 62

<210> 10  
<211> 37  
10 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

15 <400> 10  
aaggaaaaaa gcggccgctt tcagctccag ctggtt 37

<210> 11  
<211> 36  
20 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

25 <400> 11  
agagccgccg ccacctgagg agactgtgag agtggt 36  
30

<210> 12  
<211> 36  
35 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

40 <400> 12  
ggtggcgccg gctctgacat tgtgatgacc cagtct 36

<210> 13  
45 <211> 108  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: vector

50 <400> 13  
cctttctatt ctcacagtgc acaggaaatc aaagcggccg cagggtccga acaaaaactc 60  
atctcagaag aggatctgaa ttcccatcat catcaccatc actaataa 108  
55

<210> 14  
<211> 21  
60 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo  
 <400> 14  
 5 gttgttcctt tctattctca c 21

<210> 15  
 <211> 24  
 10 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo  
 15 <400> 15  
 ctcttctgag atgagttttt gtgc 24

20 <210> 16  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: scFv

<400> 16  
 30 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr  
 20 25 30  
 35 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Ile Ser Ser Asp Gly Ile Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 40 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 45 85 90 95  
 Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 50 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser  
 115 120 125  
 Glu Ser Lys Val Asp Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met  
 130 135 140  
 55 Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Asn Ala Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 60 165 170 175

Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Asn Ser Gly Val Pro  
180 185 190

5 Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
195 200 205

Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr  
210 215 220

10 Asn Ser Tyr Pro Leu Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
225 230 235 240

Lys

15

<210> 17  
<211> 232  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: diabody

25 <400> 17  
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

30 Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

35 Ala Phe Ile Ser Ser Asp Gly Ile Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

40 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

45 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met  
115 120 125

50 Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser  
130 135 140

Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ala Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr  
145 150 155 160

55 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser  
165 170 175

60 Ser Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly  
180 185 190

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala  
 195 200 205  
 5 Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Val Thr Phe Gly  
 210 215 220  
 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 225 230  
 10 <210> 18  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo  
 <400> 18  
 20 catgccatgg ggaatccgaa gtgaagctgg tggag 35  
 <210> 19  
 <211> 36  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo  
 30 <400> 19  
 catgccatgg atcccggggt gatggtgatg gtgatg 36  
 35 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: diabody MS  
 <400> 20  
 45 gactggttcc aattgacaag c 21  
 <210> 21  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: diabody MS  
 55 <400> 21  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 60 Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr  
 20 25 30



Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Asp Gly Ile Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
10 85 90 95

Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Ile Met  
15 115 120 125

Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser  
20 130 135 140

Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ala Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr  
145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser  
25 165 170 175

Ser Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly  
180 185 190

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala  
30 195 200 205

Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Val Thr Phe Gly  
35 210 215 220

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Glu Gln Lys  
225 230 235 240

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His His  
40 245 250 255

45

50